

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EFFEKTE DES NEUARTIGEN CaMKII-INHIBITORS AS100105 AUF
ELEKTROMECHANISCHE KOPPLUNG UND SR Ca²⁺-LECK IN KARDIOMYOZYTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Alexander Steffens

2018

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EFFEKTE DES NEUARTIGEN CaMKII-INHIBITORS AS100105 AUF
ELEKTROMECHANISCHE KOPPLUNG UND SR Ca²⁺-LECK IN KARDIOMYOZYTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Alexander Steffens

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lars Maier
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Frank Schweda
Tag der mündlichen Prüfung:	15. Oktober 2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Herzinsuffizienz.....	1
1.1.1 Gesellschaftliche Bedeutung.....	1
1.1.2 Prognose und Mortalität.....	2
1.1.3 Ursachen und Ausprägungsformen der Erkrankung.....	2
1.1.4 Pathophysiologische Grundlagen.....	3
1.2 Elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen.....	4
1.2.1 Systolische Ca^{2+} -Freisetzung und Kontraktion.....	5
1.2.2 Diastolische Ca^{2+} -Elimination und Relaxation.....	5
1.2.3 Regulation der elektromechanischen Kopplung.....	6
1.3 Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II.....	6
1.3.1 Vorkommen und Aufbau.....	6
1.3.2 Aktivierung und Aufrechterhaltung der Aktivität.....	7
1.3.3 Einfluss auf die elektromechanische Kopplung.....	8
1.3.4 Einfluss auf Transkriptionsprozesse.....	10
1.4 Pathophysiologische Veränderungen der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz.....	10
1.4.1 Gestörter kardiomyozytärer Ca^{2+} -Haushalt.....	10
1.4.2 SR Ca^{2+} -Leck und Hyperphosphorylierung des RyR2.....	11
1.5 Pathologisch gesteigerte CaMKII-Aktivität.....	12
1.5.1 Transgene CaMKII δ_C -Überexpression in der Maus.....	13
1.5.2 Arrhythmogene Effekte gesteigerter CaMKII-Aktivität.....	14
1.6 CaMKII-Inhibition als neuartige Therapieoption bei Herzinsuffizienz und Arrhythmien.....	14
1.6.1 Eigenschaften und Limitationen etablierter CaMKII-Inhibitoren.....	15
1.6.2 AS100105, ein neuartiger ATP-kompetitiver CaMKII-Inhibitor.....	17
1.7 Zielsetzung und Fragestellung.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Kardiomyozytenisolation und Ca^{2+} -Aufbau.....	20
2.1.1 Isolation muriner Kardiomyozyten.....	20

2.1.2	Isolation humaner Kardiomyozyten	21
2.2	Allgemeine Vorbereitungen für die Messungen	22
2.2.1	Messkammern	22
2.2.2	CaMKII-Inhibitor AS100105	22
2.2.3	Ca ²⁺ -Fluoreszenzfarbstoffe	23
2.2.4	Superfusionslösungen	24
2.2.5	Festlegung von Inhibitor- und Kontrollgruppe	25
2.2.6	Vorbereitungen am Mikroskop	25
2.3	Epifluoreszenzmikroskopische Messung muriner Kardiomyozyten	26
2.3.1	Funktionsprinzip der Messung	26
2.3.2	Untersuchung der elektromechanischen Kopplung	27
2.3.2.1	Vorbereitung der murinen Kardiomyozyten und Messbedingungen	27
2.3.2.2	Messprotokoll	28
2.3.2.3	Auswertung	30
2.3.3	Untersuchung des SR Ca ²⁺ -Lecks mittels Tetracain	33
2.3.3.1	Vorbereitung der murinen Kardiomyozyten und Messbedingungen	34
2.3.3.2	Messprotokoll	35
2.3.3.3	Auswertung	36
2.4	Konfokalmikroskopische Messung humaner Kardiomyozyten	37
2.4.1	Funktionsprinzip der Messung	37
2.4.2	Untersuchung spontaner SR Ca ²⁺ -Freisetzungseignisse	38
2.4.2.1	Vorbereitung der humanen Kardiomyozyten und Messbedingungen	39
2.4.2.2	Messprotokoll	39
2.4.2.3	Auswertung	40
2.5	Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	41
2.6	Bezugsquellen der Chemikalien	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Effekte von AS100105 in CaMKII δ_C -überexprimierenden murinen Kardiomyozyten	43
3.1.1	Biometrische Daten der CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäuse	43
3.1.2	Auswirkungen von AS100105 auf die elektromechanische Kopplung	44
3.1.2.1	Systolische Ca ²⁺ -Freisetzung und Kardiomyozytenkontraktion	45
3.1.2.2	Diastolische Ca ²⁺ -Elimination und Kardiomyozytenrelaxation	47
3.1.2.3	Post-Pausen-Zunahme von Ca ²⁺ -Transienten und Kontraktionskurven	49
3.1.2.4	SR Ca ²⁺ -Gehalt	51
3.1.3	Auswirkungen von AS100105 auf das diastolische SR Ca ²⁺ -Leck	51
3.1.3.1	Tetracain-Shift	52
3.1.3.2	Leak-Load-Relationship	53
3.2	Effekte von AS100105 in humanen Vorhofkardiomyozyten	53
3.2.1	Charakteristika der Patientinnen und Patienten	53
3.2.2	Auswirkungen von AS100105 auf das diastolische SR Ca ²⁺ -Leck	53
3.2.2.1	Ca ²⁺ -Spark-Charakteristika	55

3.2.2.2	Ca ²⁺ -Spark-Frequenz.....	56
3.2.2.3	SR Ca ²⁺ -Leck	56
3.2.2.4	Anteil sparkender Zellen.....	57
3.2.3	Auswirkungen von AS100105 auf zelluläre Arrhythmie-Korrelate	56
4	Diskussion	59
4.1	AS100105 verstärkt die systolische Ca ²⁺ -Freisetzung und Kontraktilität bei basaler Stimulation	60
4.2	AS100105 erhöht den SR Ca ²⁺ -Gehalt durch Verbesserung der Ca ²⁺ -Akkumulationsfähigkeit des SR	62
4.3	Grundlage des positiv inotropen Effekts von AS100105 ist die Reduktion des diastolischen SR Ca ²⁺ -Lecks.....	63
4.4	AS100105 reduziert das Auftreten von zellulären Arrhythmie-Korrelaten.....	64
4.5	AS100105 zeigt keine negativen Effekte auf grundlegende Mechanismen der elektromechanischen Kopplung.....	66
4.5.1	Aufrechterhaltung einer positiven Kraft-Frequenz-Beziehung.....	66
4.5.2	Keine Beeinträchtigung der diastolischen Ca ²⁺ -Elimination und der frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation	68
4.6	Perspektiven der therapeutischen Anwendung von AS100105 bei Herzinsuffizienz und kardialen Arrhythmien	70
4.6.1	Potenzial von AS100105 als Therapieoption bei Herzinsuffizienz	70
4.6.2	Potenzial von AS100105 als Therapieoption bei Arrhythmien	72
4.6.3	Pharmakologische Aspekte und mögliche Limitationen einer Therapie mit AS100105	74
5	Zusammenfassung.....	77
6	Literaturverzeichnis.....	79
7	Anhang	93
7.1	Charakteristika der Gewebespenderrinnen und Gewebespenden	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen	4
Abbildung 1-2: Aufbau, Aktivierung und Daueraktivität der CaMKII	8
Abbildung 1-3: SR Ca^{2+} -Leck nach RyR2-Phosphorylierung	11
Abbildung 1-4: Angriffspunkte wichtiger CaMKII-Inhibitoren	16
Abbildung 1-5: AS100105 wirkt inhibitorisch am aktiven Zentrum der CaMKII δ_C	17
Abbildung 1-6: AS100105 inhibiert die CaMKII unabhängig vom Autophosphorylierungszustand....	18
Abbildung 2-1: Strahlengang bei der Messung am Epifluoreszenzmikroskop	26
Abbildung 2-2: Messung bei Stimulationsfrequenz von 1 Hz	29
Abbildung 2-3: Messung bei zehnssekündiger Stimulationspause	29
Abbildung 2-4: Messung bei Koffein-Applikation	30
Abbildung 2-5: Ca^{2+} -Transienten-Analyse	31
Abbildung 2-6: Kontraktionskurven-Analyse	32
Abbildung 2-7: Messung des SR Ca^{2+} -Lecks in murinen Kardiomyozyten	35
Abbildung 2-8: Messung des Tetracain-Shifts	36
Abbildung 2-9: Strahlengang bei der Messung am Konfokalmikroskop	37
Abbildung 2-10: Konfokalmikroskopischer Line-Scan	40
Abbildung 3-1: Biometrische Daten transgener Mäuse	43
Abbildung 3-2: Ca^{2+} -Transient und Sarkomerlängenverkürzung bei 1 Hz	44
Abbildung 3-3: Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängenverkürzung bei 2 Hz und 3 Hz.....	45
Abbildung 3-4: Kraft-Frequenz-Beziehung	46
Abbildung 3-5: Relaxationskinetik der Ca^{2+} -Transienten und Kontraktionskurven	47
Abbildung 3-6: FDAR-ratio	47
Abbildung 3-7: NCX- und SERCA2a-Funktion	48
Abbildung 3-8: Post-Pausen-Zunahme von Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängenverkürzung	49
Abbildung 3-9: SR Ca^{2+} -Gehalt: Koffeininduzierter Ca^{2+} -Transient	50
Abbildung 3-10: Fractional Release bei 1-Hz-Stimulation	50
Abbildung 3-11: Tetracain- Ca^{2+} -Shift	51
Abbildung 3-12: Leak-Load-Relationship	52
Abbildung 3-13: Konfokale Line-Scans mit Ca^{2+} -Sparks	53
Abbildung 3-14: Amplitude, Dauer und Breite der Ca^{2+} -Sparks	54
Abbildung 3-15: Ca^{2+} -Spark-Größe	54
Abbildung 3-16: Ca^{2+} -Spark-Frequenz	55
Abbildung 3-17: Diastolisches SR Ca^{2+} -Leck in humanen Kardiomyozyten	55
Abbildung 3-18: Anteil sparkender Zellen	56
Abbildung 3-19: Spontane zelluläre Ca^{2+} -Freisetzung (SCaF)	57
Abbildung 3-20: Arrhythmogene Zellen und SCaF-Frequenz in diesen Zellen	57
Abbildung 3-21: Häufigkeit von SCaFs in Bezug auf alle untersuchten Zellen	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Basislösung für murine Zellen	24
Tabelle 2-2: Basislösung für humane Zellen.....	24
Tabelle 2-3: Koffein-Lösung	28
Tabelle 2-4: 0-Na ⁺ -0-Ca ²⁺ -Lösung	34
Tabelle 2-5: Tetracain-Lösung	34
Tabelle 2-6: Koffein-Lösung 0-Na ⁺ -0-Ca ²⁺	34
Tabelle 2-7: Herstellerangaben verwendeter Chemikalien	42
Tabelle 7-1: Charakteristika der Gewebespenderinnen und Gewebespender	93

Abkürzungsverzeichnis

AC3-I	<i>Autocamtide-3-derived inhibitory peptide</i>
AIP	<i>Autocamtide-2-related inhibitory peptide</i>
ANF	atriales natriuretisches Peptid (<i>atrial natriuretic factor</i>)
AS	Inhibitorgruppe mit AS1000105
β -MHC	schwere β -Myosin-Kette (<i>β-myosin-heavy-chain</i>)
CaMKII	Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaM-KIIN	Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor protein
CaMKP	Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase Phosphatase
Ca^{2+} -Rt80	Zeit bis zum 80-prozentigen Abfall des systolischen Ca^{2+} -Transienten (<i>Ca^{2+}-return-time-80</i>)
DAD	späte Nachdepolarisation (<i>delayed afterdepolarization</i>)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
EAD	frühe Nachdepolarisation (<i>early afterdepolarization</i>)
FD	Dauer eines Ca^{2+} -Sparks (<i>full duration</i>)
FDAR	frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation (<i>frequency dependent acceleration of relaxation</i>)
FFR	Kraft-Frequenz-Beziehung (<i>force frequency relationship</i>)
FS	Größe eines Ca^{2+} -Sparks (<i>full size</i>)
FW	Breite eines Ca^{2+} -Sparks (<i>full width</i>)
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mittlerer linksventrikulärer Ejektionsfraktion (<i>heart failure with mid-range ejection fraction</i>)
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (<i>heart failure with preserved ejection fraction</i>)
HFrfEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (<i>heart failure with reduced ejection fraction</i>)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (<i>half maximal inhibitory concentration</i>)
K	Kontrollgruppe
KK	Kontraktionskurve
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCX	Na^{+} - Ca^{2+} -Austauscher
PKA	Proteinkinase A
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP2C	Proteinphosphatase 2C
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)

RSLV	relative Sarkomerlängenverkürzung
RT	Raumtemperatur
Rt80	<i>return-time-80</i>
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SCaF	spontane zelluläre Ca^{2+} -Freisetzung
SEM	Standardfehler (<i>standard error of mean</i>)
SERCA2a	sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase
SL-Rt80	Zeit bis zum 80-prozentigen Abfall der systolischen Sarkomerlänge (<i>sarcomere-length-return-time-80</i>)
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	transverse aortale Konstriktion (<i>transverse aortic constriction</i>)

1 Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten internistischen Erkrankungen [1]. Im insuffizienten Myokard wurden pathophysiologische Veränderungen des kardiomyozytären Ca^{2+} -Haushalts nachgewiesen [2, 3]. Als wichtigem Regulationsenzym wird der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) in diesem Zusammenhang eine zentrale Bedeutung beigemessen [4]. Für die experimentelle Inhibition der CaMKII konnten positive Effekte auf insuffizientes Myokard nachgewiesen werden [5, 6]. Arrhythmien sind eine häufige Komplikation bei Herzinsuffizienz und wesentliche Ursache der Mortalität bei dieser Erkrankung [7]. Vielversprechende antiarrhythmogene Wirkungen von CaMKII-Inhibitoren konnten experimentell ebenfalls bereits demonstriert werden [8 - 10]. Die CaMKII ist daher ein wichtiges therapeutisches Zielprotein der medizinischen Forschung und CaMKII-Inhibitoren werden als potenzielle Wirkstoffe für die Behandlung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien betrachtet. Die etablierten Forschungssubstanzen zur CaMKII-Inhibition sind jedoch nicht für die Anwendung an Patientinnen und Patienten geeignet [11], weshalb aktuell neue CaMKII-Inhibitoren für den klinischen Einsatz in Entwicklung sind. In der vorliegenden Arbeit sollen funktionelle Eigenschaften des neuartigen CaMKII-Inhibitors AS100105 durch Versuche an isolierten Kardiomyozyten untersucht werden.

1.1 Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz wird definiert als Unvermögen des Herzens die Organe mit genügend Blut und damit Sauerstoff zu versorgen, um die Stoffwechselvorgänge in Ruhe und unter Belastung aufrechtzuerhalten. Als Folge der kardialen Funktionseinschränkung äußern sich Symptome wie Leistungsminderung, Dyspnoe, und Flüssigkeitsretention. [12]

1.1.1 Gesellschaftliche Bedeutung

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz liegt in der westlichen Welt bei etwa 1 - 2 % bei einer Inzidenz von 5 - 10 Neuerkrankungen pro 1000 Personen pro Jahr [13]. Allein in Europa wird die Zahl der Erkrankten auf 14 Millionen geschätzt [1]. Herzinsuffizienz zeichnet sich durch periodische behandlungsbedürftige Exazerbationen aus und ist der häufigste Grund für eine

Hospitalisierung in der Altersgruppe über 65 Jahren [14]. Aufgrund des demografischen Wandels ist in Deutschland bis 2025 im Vergleich zu 1995 mit einer Zunahme der Erkrankungsfälle um 61,8 % zu rechnen [15]. Der Erforschung von neuen Therapieoptionen für die Herzinsuffizienz kommt daher eine hohe Bedeutung zu.

1.1.2 Prognose und Mortalität

Trotz verbesserter Behandlungsmöglichkeiten ist die Prognose der Betroffenen weiterhin schlecht. In Deutschland stellt die Herzinsuffizienz die dritthäufigste Todesursache dar [16]. Etwa die Hälfte der Erkrankten verstirbt innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung [17]. Für die hohe Mortalität der Herzinsuffizienz ist dabei nicht nur die progressive ventrikuläre Dysfunktion verantwortlich. Mit einem Anteil von 35 bis 45 % unter den kardialen Todesursachen versterben die Patientinnen und Patienten etwa genauso häufig an plötzlichem Herztod aufgrund von malignen ventrikulären Tachykardien [18]. Selbst nach Therapie mit einem implantierbaren Kardioverter-Defibrillator waren maligne ventrikuläre Tachykardien in einer aktuelleren Studie noch für 20 % aller Todesfälle bei Herzinsuffizienz verantwortlich [7].

1.1.3 Ursachen und Ausprägungsformen der Erkrankung

Bei der chronischen Herzinsuffizienz handelt es sich um ein komplexes, multifaktorielles Syndrom mit vielfältigen klinischen Ausprägungsformen. Eine wichtige Form der Klassifikation der Erkrankung wird in Bezug auf die Störungen der systolischen Kontraktionskraft und der diastolischen Relaxationsfähigkeit des Herzmuskels vorgenommen. Während einige Autoren weiterhin diastolische und systolische Herzinsuffizienz unterscheiden [19, 20], differenziert eine neuere Form der Einteilung zwischen Herzinsuffizienz mit reduzierter (HFrEF, LVEF < 40 %) und erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (HFpEF, LVEF ≥ 50 %) [21, 22]. Eine strikte binäre Einteilung der Erkrankung in abgrenzbare Unterformen wird dabei kritisch in Frage gestellt [23, 24]. So konnte für die linksventrikuläre Ejektionsfraktion in einer Population von Herzinsuffizienz-Patientinnen und -Patienten eine Gauß'sche Verteilungskurve nachgewiesen werden [25, 26]. Systolische und diastolische Abnormalitäten scheinen in einem kontinuierlichen Spektrum an überlappenden Ausprägungsformen bei allen Formen der Herzinsuffizienz in variablen Proportionen vorzuliegen [24]. In Anbetracht dessen wurde in den aktuellen Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) 2016 der Terminus Herzinsuffizienz mit mittlerer

Ejektionsfraktion (HFmrEF, LVEF 40 - 49 %) ergänzt [27]. Auch für weitere kardiale Veränderungen wie z.B. fibrotische Umbauprozesse des Myokards („*remodelling*“), für Komorbiditäten und für biologische Charakteristika wie Alter und Geschlecht findet sich ein abgestuftes Verteilungsmuster innerhalb des Krankheitsspektrums der Herzinsuffizienz [28, 29]. Jedwede Form der Klassifikation betont daher lediglich einen Teilaspekt der Erkrankung als komplexes biologisches System, in dem multiple ätiologische und pathophysiologische Faktoren zur individuellen Ausprägung der Erkrankung führen. Dennoch kann die Klassifikation bei der Einstufung der Erkrankung und der Auswahl einer individuellen Therapie hilfreich sein. [24]

Zu 70 - 90 % liegt der Herzinsuffizienz eine koronare Herzkrankheit oder eine arterielle Hypertonie zugrunde. Seltener Ursachen sind andere nicht-ischämische Kardiomyopathien, Myokarditis, Herzklappenerkrankungen, Arrhythmien und Perikarderkrankungen sowie Alkoholmissbrauch und kardiotoxische Arzneimittel [30]. Für die HFpEF wird allerdings angenommen, dass sie neben der arteriellen Hypertonie das Resultat weiterer Begleiterkrankungen wie Übergewicht, Diabetes mellitus Typ II und COPD darstellt, welche einen systemisch-proinflammatorischen Zustand begünstigen [31]. Im Gegensatz zur HFrEF scheint die Heterogenität der Ausprägungsformen der HFpEF in diesem Zusammenhang viel größer zu sein, was das mangelnde Ansprechen auf die etablierten Therapieformen der Herzinsuffizienz bei Betroffenen erklären könnte [21, 32].

1.1.4 Pathophysiologische Grundlagen

Die etablierten medikamentösen Therapiemöglichkeiten der Herzinsuffizienz wirken v. a. den negativen Effekten einer chronischen neurohumoralen Aktivierung im Rahmen des kardialen Pumpversagens entgegen. Die Aktivierung des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ist zwar kurzfristig in der Lage, die Pumpfunktion des Herzens zu steigern, langfristig werden jedoch kardiale Remodelling-Prozesse induziert, welche die Herzfunktion im Sinne eines Circulus Vitiosus weiter einschränken. Dabei tragen auch krankheitsmodifizierende biologische Charakteristika und Komorbiditäten zu den Umbauprozessen bei, indem sie über molekulare Mechanismen jeweils zahlreiche komplexe intrazelluläre Signalkaskaden rekrutieren, welche letztlich u. a. zur Beeinflussung kontraktiler Proteine, der elektromechanischen Kopplung und von Signalwegen der Hypertrophie und des Zellmetabolismus führen. [24]

Insbesondere scheint auch ein Remodelling des kardiomyozytären Ca^{2+} -Haushalts bei Herzinsuffizienz und den herzinsuffizienzassoziierten Arrhythmien eine wichtige Rolle zu spielen [10, 33]. Ein zunehmend besseres Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen ermöglicht dabei die Entdeckung neuer therapeutischer Zielproteine.

1.2 Elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen

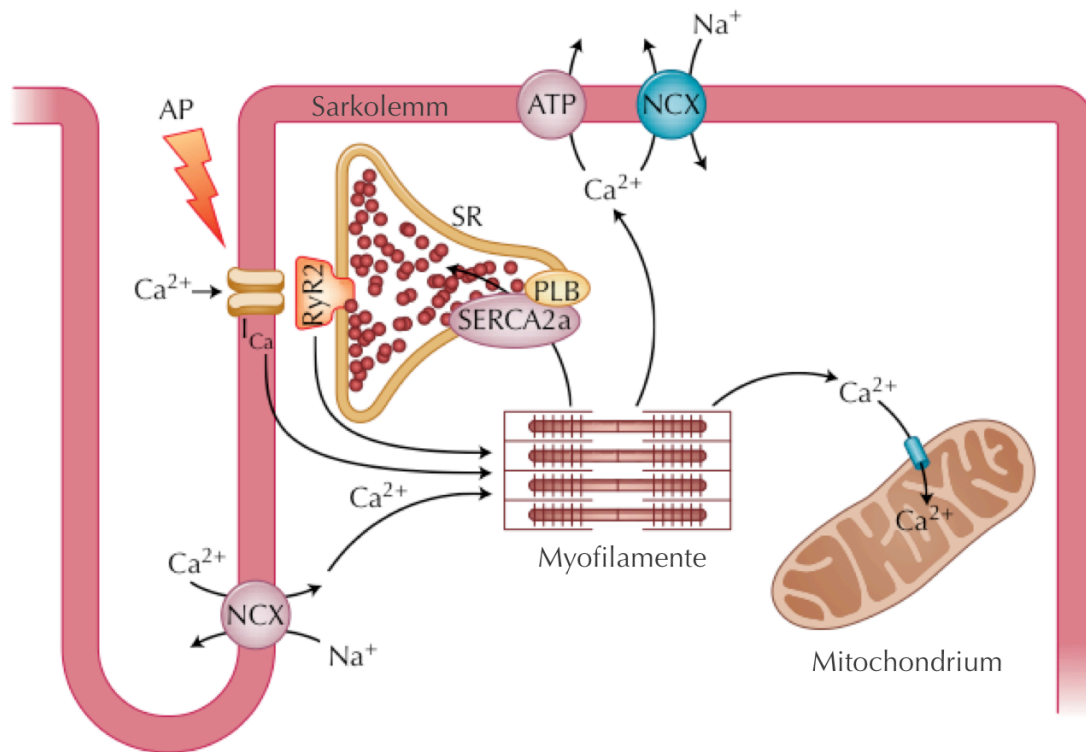


Abbildung 1-1: Elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen

Durch das Aktionspotenzial (AP) kommt es zum Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (I_{Ca}), wodurch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über die kardialen Ryanodinrezeptoren (RyR2) induziert wird. Ca^{2+} -Ionen aktivieren die Myofilamente und lösen so die systolische Kontraktion der Zelle aus. Während der Diastole gelangt das Ca^{2+} über die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) zurück in das SR, wobei Phospholamban (PLB) die Aktivität dieses Transporters reguliert. Der Na^{+} - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) eliminiert Ca^{2+} nach extrazellulär, kann während des AP jedoch auch zum Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle beitragen. In geringem Umfang wird das zytosolische Ca^{2+} auch über die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter eliminiert. Abbildung nach Neef und Maier 2007 [4], © 2007 by Current Medicine Group LLC mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags.

Die elektromechanische Kopplung beschreibt den Vorgang der Umsetzung der elektrischen Stimulation in die mechanische Kontraktion des Herzens. Eine entscheidende Rolle spielt dabei der Ca^{2+} -Haushalt der Kardiomyozyten. Ca^{2+} fungiert als sekundärer Botenstoff, aktiviert direkt die Myofilamente und löst so die Kontraktion der Herzmuskelzellen aus [34]. Abbildung 1-1 veranschaulicht die systolischen und diastolischen Ca^{2+} -Transportvorgänge bei der elektromechanischen Kopplung, die im Folgenden detaillierter erläutert werden.

1.2.1 Systolische Ca^{2+} -Freisetzung und Kontraktion

Bei Depolarisation der Zellmembran durch das kardiale Aktionspotenzial werden spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle aktiviert und es kommt zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Im Sinne einer Ca^{2+} -induzierten- Ca^{2+} -Freisetzung [35] erfolgt daraufhin die Öffnung von Ca^{2+} -sensitiven Ca^{2+} -Freisetzungskanälen (kardiale Ryanodin-Rezeptoren, RyR2) in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Durch die Kombination aus Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und Ca^{2+} -Freisetzung aus dem zellulären Ca^{2+} -Speicher des SR steigt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration von diastolisch ca. 100 $\mu\text{mol/l}$ auf einen systolischen Spitzenwert von ca. 1000 $\mu\text{mol/l}$, wodurch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an das Myofilamentprotein Troponin C ermöglicht wird. Dadurch werden die kontraktile Myofilamente aktiviert und es kommt zur Verkürzung der Sarkomereinheiten und damit zur Kontraktion der Zelle. [34]

1.2.2 Diastolische Ca^{2+} -Elimination und Relaxation

Für die erneute Relaxation der Myofilamente während der Diastole muss die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wieder abfallen. Hierzu erfolgt die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR durch die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), welche durch das Polypeptid Phospholamban (PLB) in ihrer Aktivität reguliert wird. Außerdem sorgt der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) für die Elimination von Ca^{2+} -Ionen in den Extrazellulärraum. Seine Aktivität ist dabei umkehrbar abhängig vom Membranpotenzial und den vorherrschenden Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen, so dass der Transporter u. a. während des Aktionspotenzials kurzzeitig auch zum Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle beiträgt. [34]

Je nach Spezies unterscheidet sich die Dichte von NCX und SERCA2a in Kardiomyozyten [36] und damit auch ihr Anteil am Abtransport des freigesetzten Ca^{2+} [37]. In Mäuseherzzellen werden 90 % des Ca^{2+} über die SERCA2a zurück in das SR befördert, während der NCX 9 % des Ca^{2+} aus der Zelle eliminiert [38, 39]. In humanen Herzmuskelzellen gelangen dagegen etwa 70 % des Ca^{2+} über die SERCA2a zurück in das SR, während der NCX 28 % des Ca^{2+} nach extrazellulär abtransportiert. Als weitere Transporter tragen die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter zum Abfall des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels bei. Ihr Einfluss auf die Ca^{2+} -Elimination ist mit einem Anteil von 1 - 2 % jedoch äußerst gering. [34]

1.2.3 Regulation der elektromechanischen Kopplung

Die Stärke der kardialen Kontraktion kann maßgeblich durch die Menge und Dauer der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung und durch die Ca^{2+} -Sensibilität der Myofilamente beeinflusst werden [34].

Die Proteinkinase A (PKA) vermittelt auf molekularer Ebene die gesteigerte Kontraktionskraft (Inotropie) und die beschleunigte Relaxation des Herzmuskels (Lusitropie) als Effekte β -adrenerger Stimulation im Rahmen der Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Die Phosphorylierung ihrer Zielproteine führt zur Modulation der elektromechanischen Kopplung. So verliert durch die PKA (an Ser-16) phosphoryliertes Phospholamban seinen inhibitorischen Effekt auf die SERCA2a, die somit Ca^{2+} schneller zurück in das SR befördern kann. Die Phosphorylierung von Troponin I sorgt an den Myofilamenten für eine schnellere Dissoziation von Ca^{2+} . Beide Prozesse haben damit einen positiv lusitropen Effekt. Positiv inotrop wirkt die PKA-bedingte Phosphorylierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, durch die der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle bei elektrischer Erregung verstärkt wird. Durch die gesteigerte SERCA2a-Aktivität erhöht sich zudem der Ca^{2+} -Gehalt des SR. Im Zusammenspiel mit der PKA-bedingten Phosphorylierung des RyR2 erhöht sich so die systolische SR Ca^{2+} -Freisetzung im Anschluss an ein Aktionspotenzial. [34]

Für die komplexe Feinregulation der elektromechanischen Kopplung ist neben der PKA auch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) von zentraler Bedeutung, wie nachfolgend dargestellt wird.

1.3 Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist eine multifunktionelle Serin-Threonin-Kinase. Bei steigender intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration erfolgt die klassische Aktivierung der CaMKII, woraufhin sie zahlreiche Zielproteine phosphorylieren und so in ihrer Aktivität regulieren kann. Im Herzen ist die CaMKII dadurch wesentlich an der Modulation der kardiomyozytären Ca^{2+} -Homöostase beteiligt. [40]

1.3.1 Vorkommen und Aufbau

Es sind vier unterschiedliche Isoformen der CaMKII bekannt. Die α - und β -Isoformen sind hauptsächlich im Gehirn zu finden, wohingegen die γ - und δ -Isoformen ubiquitär in nahezu allen Gewebearten exprimiert werden [41]. In Herzmuskelzellen ist die δ -Isoform mit den

Splicevarianten δ_B und δ_C vorherrschend [42]. Die CaMKII δ_C findet sich vor allem im Zytosol der Kardiomyozyten, während die CaMKII δ_B aufgrund einer Kernlokalisationssequenz im Aminosäurecode vorwiegend im Nukleus lokalisiert ist [43].

Alle Isoformen der CaMKII weisen eine aminoterminal katalytische Domäne, eine zentrale regulatorische Domäne und eine carboxyterminale Assoziationsdomäne auf. Auf der regulatorischen Domäne findet sich eine autoinhibitorische Region und die Bindungsstelle für das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin [40]. Die Assoziationsdomäne erlaubt die Oligomerisierung der CaMKII zu radförmigen multimeren Holoenzymen bestehend aus 6 - 12 Untereinheiten [44, 45].

1.3.2 Aktivierung und Aufrechterhaltung der Aktivität

Im inaktiven Zustand blockiert die autoinhibitorische Region der CaMKII die Substratbindungsstelle des Enzyms. Bei steigenden Ca^{2+} -Konzentrationen assoziieren vier Ca^{2+} -Ionen und Calmodulin zu einem Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex, welcher nach Bindung an die regulatorische Domäne der CaMKII die Freilegung der Substratbindungsstelle bewirkt und die CaMKII damit in den aktiven Zustand versetzt. [40]

Die Aktivierung der CaMKII ermöglicht die Autophosphorylierung des Enzyms an Thr-287 [46]. Die autophosphorylierte CaMKII weist eine erhöhte Affinität zum Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex auf, welcher dadurch weniger leicht dissoziiert und so den aktiven Zustand der CaMKII auch bei sinkenden Ca^{2+} -Konzentrationen (z. B. während der Diastole) länger aufrechterhält [47]. Nach Dissoziation des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes ermöglicht die Autophosphorylierung zudem eine Ca^{2+} -unabhängige autonome Teilaktivität der CaMKII [48, 49], da die inhibierende Interaktion der Substratbindungsstelle mit der regulatorischen Domäne verhindert wird [46]. Die Autophosphorylierung verleiht der CaMKII damit eine Art „Gedächtnis“ in Bezug auf Fluktuationen der Ca^{2+} -Konzentration [50]. Erhöht sich die Frequenz der Erregung, so verkürzen sich auch die Intervalle zwischen den Anstiegen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der aktivierende Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex bleibt zunehmend an die autophosphorylierte CaMKII gebunden. Bei jedem folgenden Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration steht erneut Ca^{2+} -beladenes Calmodulin zur Aktivierung weiterer CaMKII-Moleküle zur Verfügung [51]. Veränderungen der Stimulationsfrequenz (z. B. bei Erhöhung der Herzfrequenz) können so in ein bestimmtes Aktivitätsniveau der CaMKII übersetzt werden [50]. Eine vollständige Deaktivierung der autophosphorylierten CaMKII erfolgt durch Proteinphosphatasen wie PP1, PP2A, PP2C und CaMKP [52].

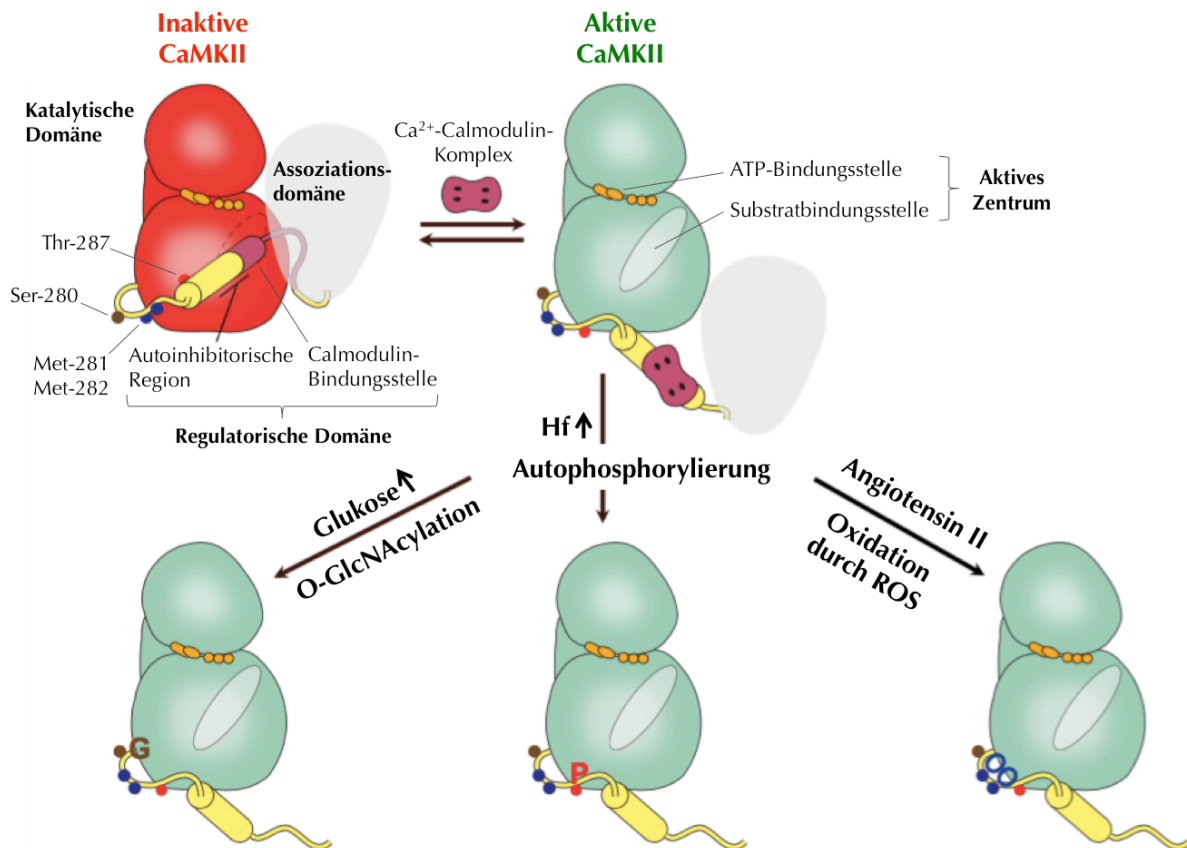


Abbildung 1-2: Aufbau, Aktivierung und Daueraktivität der CaMKII

Die CaMKII besitzt eine aminoterminal katalytische Domäne, eine zentrale regulatorische Domäne und eine carboxyterminale Assoziationsdomäne. Durch Bindung des Ca²⁺-Calmodulin-Komplexes wird die Substratbindungsstelle durch Dissoziation der autoinhibitorischen Region freigelegt. Das aktive Zentrum der CaMKII ist nun in der Lage nach ATP-Bindung Zielproteine zu phosphorylieren. Dies schließt eine Autophosphorylierung der CaMKII ein, wodurch diese im aktiven Zustand verbleibt. Über diesen Mechanismus führt u. a. eine Erhöhung der Herzfrequenz (Hf) zu einer gesteigerten Aktivität der CaMKII. Zudem existieren Ca²⁺-Calmodulin-unabhängige Mechanismen zur Aktivierung der CaMKII: O-GlcNAcylation an Ser-280 bei erhöhten Glukosekonzentrationen und Oxidation durch z. B. von Angiotensin II induzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an Met-281 und Met-282. Abbildung nach Pellicena und Schulman 2014 [11] mit freundlicher Genehmigung durch die Autoren.

Zudem existieren zwei weitere, von Ca²⁺ und Calmodulin unabhängige Mechanismen zur Aktivierung der CaMKII. Dies sind die Oxidation durch z. B. von Angiotensin II induzierten reaktiven Sauerstoffspezies („*reactive oxygen species*“, ROS) an den Stellen Met-281/282 [53] und die Glykosylierung bei erhöhten Glukose-Konzentrationen durch Übertragung einer Sauerstoff-gebundenen N-Acetyl-Glukosaminogruppe („*O-GlcNAcylation*“) an der Stelle Ser-280 [54]. Wie bei der Autophosphorylierung kommt es auch infolge von Oxidation und Glykosylierung zu einer „Daueraktivität“ der CaMKII [11].

1.3.3 Einfluss auf die elektromechanische Kopplung

Die δ_C -Splicevariante der CaMKII ist durch die Phosphorylierung zahlreicher Zielproteine an der Regulation der elektromechanischen Kopplung beteiligt [55]. Aufgrund ihrer

Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung kann die CaMKII als indirektes Effektorprotein der β -adrenergen Stimulation wirken [56] und deren positiv inotrope und positiv lusitrope Auswirkungen unter physiologischen Bedingungen durch synergistische Effekte mit der PKA zum Teil verstärken. Auch die CaMKII-bedingte Phosphorylierung erhöht die Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und fördert damit den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Phospholamban wird durch die CaMKII an Thr-17 phosphoryliert [57], wodurch es zu einer Enthemmung der Aktivität der SERCA2a kommt [58]. Der RyR2 wird durch die CaMKII spezifisch an der Stelle Ser-2815 phosphoryliert [59]. Zudem bestehen Hinweise auf eine Phosphorylierung an Ser-2809. Insgesamt scheint das Potenzial der CaMKII-bedingten Phosphorylierung des RyR2 gegenüber der PKA zu überwiegen [60]. Eine Vielzahl von Studien konnte demonstrieren, dass die CaMKII-bedingte Phosphorylierung der RyR2-Proteine die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR verstärkt [59, 61, 62], wobei allerdings auch gegenteilige Auswirkungen mit verminderter Ca^{2+} -Freisetzung beobachtet wurden [63]. Die Effekte der PKA- und CaMKII-bedingten Phosphorylierung des RyR2 werden insbesondere in Zusammenhang mit einer pathologischen erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der SR Ca^{2+} -Freisetzungskanäle im Rahmen der Herzinsuffizienz intensiv diskutiert (vgl. 1.4.2).

Weitere Effekte der CaMKII betreffen kardiale Na^+ - [64] und K^+ -Kanäle [65], durch deren Phosphorylierung die CaMKII das Membranpotenzial und die elektromechanische Kopplung moduliert. Auch ein direkter Einfluss der CaMKII auf die kontraktilen Myofilamente über die Phosphorylierung der Strukturproteine Troponin I [66] und Titin [67] konnte nachgewiesen werden.

Das frequenzabhängige Aktivitätsmuster der CaMKII (vgl. 1.3.2) wird mit wichtigen physiologischen Effekten in Zusammenhang gebracht, welche bei Steigerung der Herzfrequenz die systolische Auswurfleistung des Herzens erhöhen und eine ausreichende diastolische Füllung der Herzkammern ermöglichen sollen. So beeinflusst die CaMKII vermutlich die Kraft-Frequenz-Beziehung („*force frequency relationship*“, FFR) im Herzen, indem sie zu einer Optimierung der kardialen Kontraktionskraft bei Frequenzsteigerung beiträgt [68, 69]. In diesem Zusammenhang könnte auch die Erleichterung („*facilitation*“) des Ca^{2+} -Einstroms über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle durch die Aktivität der CaMKII eine wichtige Rolle spielen [70, 71]. Zudem wird der Einfluss der CaMKII auf die frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation („*frequency dependent acceleration of relaxation*“, FDAR) diskutiert [66, 72].

1.3.4 Einfluss auf Transkriptionsprozesse

An der Regulation der kardiomyozytären Genexpression sind die δ_B - und die δ_C -Splicevariante der CaMKII δ beteiligt [55]. Die Phosphorylierung von Histon-Deacetylasen (HDAC) durch die CaMKII bedingt deren Dissoziation vom Transkriptionsfaktor MEF2, durch dessen konsekutive Aktivierung Hypertrophie-induzierende Transkriptionsprozesse ausgelöst werden [73]. Die CaMKII scheint dabei spezifisch die HDAC4 zu phosphorylieren, die daraufhin vermehrt aus dem Nukleus in das Zytosol exportiert und vermindert in den Kern importiert wird, was in einer kardiomyozytären Hypertrophie resultiert [74].

1.4 Pathophysiologische Veränderungen der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz

1.4.1 Gestörter kardiomyozytärer Ca^{2+} -Haushalt

Kontraktile Dysfunktion und Relaxationsstörung des Myokards bei Herzinsuffizienz stehen, wie im Folgenden dargestellt, in Zusammenhang mit Veränderungen des Ca^{2+} -Haushalts der Kardiomyozyten.

Die systolische Ca^{2+} -Freisetzung ist bei Herzinsuffizienz deutlich eingeschränkt [75, 76], wodurch weniger Ca^{2+} für die Aktivierung der kontraktilen Myofilamente zur Verfügung steht (vgl. 1.2.1). Als zentrale Ursache wurde eine reduzierte Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR [77] mit Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehalts [78, 79] nachgewiesen. Bedingt durch die verringerte Aktivität der SERCA2a bei Herzinsuffizienz, ist die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR eingeschränkt [80, 81]. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf eine verminderte Expression der SERCA2a [82] und auf eine reduzierte Phosphorylierung von Phospholamban [81, 83], die in Zusammenhang mit einer erhöhten Phosphatase-Aktivität bei Herzinsuffizienz stehen könnte [84]. Zudem scheinen diastolische Ca^{2+} -Verluste aus dem SR eine wichtige Rolle zu spielen. Das physiologische SR Ca^{2+} -Leck über den RyR2 ist in seinem Ausmaß stark abhängig vom SR Ca^{2+} -Gehalt [85], zeigt sich jedoch bei Herzinsuffizienz auch bei Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehalts deutlich verstärkt [5, 6, 86]. Die Verminderung der SERCA2a-Aktivität und das erhöhte SR Ca^{2+} -Leck tragen zu einer Störung der diastolischen Ca^{2+} -Elimination bei und beeinträchtigen so die Relaxation der Myofilamente (vgl. 1.2.2). Ein gesteigertes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck führt zu erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen während der Diastole [9]. Da sich die Aktivität des NCX bei Herzinsuffizienz im Verhältnis zur SERCA2a verstärkt zeigt, kommt es zu einem vermehrten

Ca^{2+} -Transport nach extrazellulär [80]. Durch diesen Ca^{2+} -Verlust aus den Zellen kann der SR Ca^{2+} -Gehalt auch bei steigender Herzfrequenz nicht ausreichend erhöht werden. Während sich die Kontraktilität in gesundem humanen Myokard bei Anstieg der Herzfrequenz verstärkt (positive Kraft-Frequenz-Beziehung), kommt es dadurch bei Herzinsuffizienz zu einer frequenzabhängigen Verschlechterung der myokardialen Kontraktionsstärke im Sinne einer negativen Kraft-Frequenz-Beziehung [79].

1.4.2 SR Ca^{2+} -Leck und Hyperphosphorylierung des RyR2

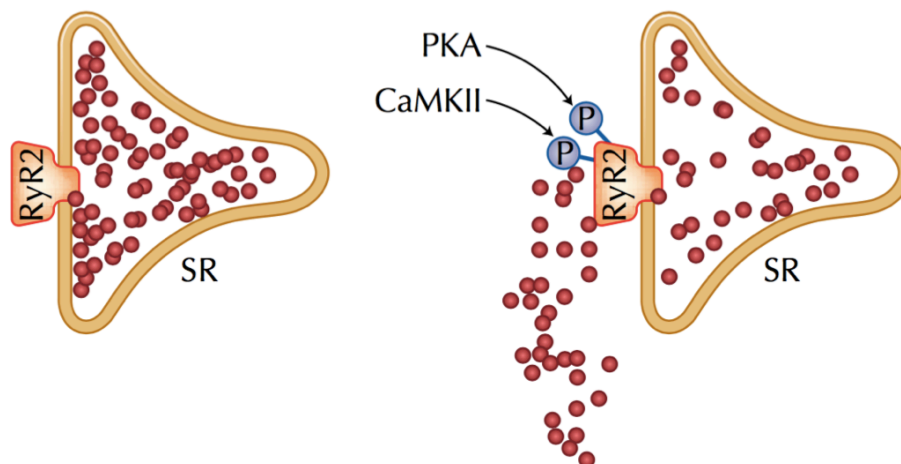


Abbildung 1-3: SR Ca^{2+} -Leck nach RyR2-Phosphorylierung

Illustrative Darstellung des diastolischen Verlusts von Ca^{2+} -Ionen (rote Punkte) aus dem SR infolge einer Hyperphosphorylierung des RyR2 durch CaMKII oder PKA. Abbildung nach Neef und Maier 2007 [4], © 2007 by Current Medicine Group LLC mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags.

Normalerweise sind die SR Ca^{2+} -Freisetzungskanäle während der Diastole geschlossen [33]. Im Rahmen der Herzinsuffizienz ist die Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 jedoch kritisch verändert und es kommt zu einem starken Anstieg von unsynchronisierten diastolischen Ca^{2+} -Freisetzungsereignissen in Form von „ Ca^{2+} -Sparks“: Durch die erhöhte spontane diastolische Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 bei Herzinsuffizienz kommt es zu lokalen Anstiegen der Ca^{2+} -Konzentration, welche hinreichend sind, die kurzzeitige Öffnung eines ganzen Clusters von RyR2 hervorzurufen. Hierdurch kommt es zu einem diastolischen Ca^{2+} -Verlust aus dem SR, welcher zur pathologischen Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehalts beiträgt [5, 6, 86 - 88]. Anzumerken ist dabei, dass Santiago et al. (2010) Ca^{2+} -Verluste über den RyR2 messen konnten, ohne dass in den untersuchten Kardiomyozyten simultan Ca^{2+} -Sparks auftraten. Auch geringfügige Ca^{2+} -Verluste unterhalb der Detektionsschwelle von Ca^{2+} -Sparks könnten daher zum diastolischen SR Ca^{2+} -Leck beitragen [89]. Dem pathologischen SR Ca^{2+} -Leck scheint eine Hyperphosphorylierung des RyR2 zugrunde zu liegen, die im Rahmen einer

verstärkten Aktivität sowohl der PKA [86, 90] als auch der CaMKII [9, 91] festgestellt wurde (Abbildung 1-3). Welche der beiden Proteinkinasen bei Herzinsuffizienz entscheidend zur Hyperphosphorylierung des RyR2 und dem resultierenden SR Ca^{2+} -Leck beiträgt wird kontrovers diskutiert.

Marx et al. (2000) lokalisierten Ser-2809 als entscheidende Phosphorylierungsstelle der PKA am RyR2 und demonstrierten, dass die PKA-bedingte Hyperphosphorylierung an Ser-2809 im insuffizienten Myokard ein gesteigertes SR Ca^{2+} -Leck verursacht [86]. Diese Befunde wurden jedoch durch andere Ergebnisse in Frage gestellt. So konnte im transgenen Mausmodell S2809A mit genetischer Ablation der PKA-Phosphorylierungsstelle an Ser-2809 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine Reduktion von Ca^{2+} -Sparks nachgewiesen werden. Nach Induktion einer Herzinsuffizienz durch transverse aortale Konstriktion („*transverse aortic constriction*“, TAC) zeigten die Mäuse zudem eine unveränderte Progression des pathologischen kardialen Remodelling [92]. In Übereinstimmung damit konnte in weiteren Studien keine vermehrte Phosphorylierung des RyR2 an Ser-2809 im insuffizienten Myokard festgestellt werden [93, 94]. Eine Begründung dafür liefert der Nachweis, dass die Sensibilität gegenüber der β -adrenergen Stimulation und die Dichte an β -Rezeptoren bei Herzinsuffizienz reduziert ist [95] und die PKA damit über diesen Mechanismus nur noch vermindert aktiviert werden kann. Zwar lässt sich durch β -adrenerge Stimulation eine Zunahme des SR Ca^{2+} -Lecks generieren [96], jedoch erwies sich die Unterdrückung der PKA-Aktivität im Gegensatz zur CaMKII-Inhibition wiederholt als ineffektiv eine Reduktion des gesteigerten SR Ca^{2+} -Verlusts zu bewirken [87, 96, 97]. Es gibt zudem deutliche Hinweise darauf, dass eine Steigerung des SR Ca^{2+} -Lecks durch die PKA lediglich ein indirekter Effekt einer erhöhten SERCA2a-Aktivität nach Phosphorylierung von Phospholamban sein könnte, denn in Phospholamban-Knockout-Mäusen (PLB-KO) konnte die Aktivierung der PKA [98, 99] im Gegensatz zur CaMKII [99] keine Erhöhung des SR Ca^{2+} -Lecks bewirken.

1.5 Pathologisch gesteigerte CaMKII-Aktivität

Die Expression der CaMKII ist bei Herzinsuffizienz sowohl im Tiermodell [87, 100, 101] als auch im humanen insuffizienten Myokard [6, 102, 103] deutlich erhöht und ein größerer Anteil des Enzyms befindet sich im autophosphorylierten daueraktiven Zustand [91, 104]. Expression und Aktivität der CaMKII korrelieren dabei positiv mit der Einschränkung der ventrikulären Ejektionsfraktion, so dass zunächst spekuliert wurde, ob die positiv inotropen und positiv lusitropen Effekte der CaMKII-bedingten Phosphorylierungen von L-Typ- Ca^{2+} -

Kanälen, SERCA2a oder RyR2 (vgl. 1.3.3) einen frühen Kompensationsmechanismus des kardialen Pumpversagens bei Herzinsuffizienz darstellen könnten [103]. Durch Studien an transgenen Mäusen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Überexpression der CaMKII δ_B [105] und vor allem der CaMKII δ_C [5, 91] direkt an der Entstehung und Aufrechterhaltung pathophysiologischer Veränderungen bei Herzinsuffizienz beteiligt ist. Bei gesteigerter Aktivität der CaMKII konnte sowohl im Tiermodell [5, 8, 87] als auch im insuffizienten humanen Myokard [6, 106] eine pathologische Erhöhung des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks und eine Reduktion des SR Ca²⁺-Gehalts nachgewiesen werden, die mit einer kontraktilen Dysfunktion des kardialen Gewebes assoziiert waren.

1.5.1 Transgene CaMKII δ_C -Überexpression in der Maus

Die transgene Überexpression der CaMKII δ_C führte im Mausmodell zur Entwicklung einer deutlichen Herzhypertrophie mit dilatativer Herzinsuffizienz. Im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren verstarben die Mäuse frühzeitig. Auf genetischer Ebene wurden durch die CaMKII δ_C -Überexpression Transkriptionsprozesse induziert, die mit Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz assoziiert sind. So konnten deutlich erhöhte mRNA-Level von Hypertrophie-Markergenen wie ANF, β -MHC und α -skeletalem Aktin nachgewiesen werden. Isolierte Kardiomyozyten der transgenen Mäuse waren entsprechend vergrößert und wiesen eine verminderte Kontraktionsfähigkeit auf. [91]

In Kardiomyozyten von CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäusen konnten Herzinsuffizienz-typische pathologische Veränderungen des Ca²⁺-Haushalts demonstriert werden: So war die Expression und Aktivität der SERCA2a reduziert, während eine Steigerung der NCX-Funktion festzustellen war. Dies impliziert einen Ca²⁺-Verlust der Zelle nach extrazellulär, was durch den Nachweis einer Verminderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration während der Diastole und einer mehr als 50-prozentigen Reduktion des SR Ca²⁺-Gehalts bestätigt werden konnte. Die systolische Ca²⁺-Freisetzung zeigte sich entsprechend deutlich verringert. Ein umfangreicher Ca²⁺-Verlust aus dem SR konnte dabei in Form einer Zunahme des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks mit vermehrt auftretenden Ca²⁺-Sparks demonstriert werden [5]. Durch Nachweis einer pathologisch verstärkten CaMKII-bedingten Phosphorylierung des RyR2, die bereits vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz in diesem Mausmodell auftrat, konnte der entscheidende Einfluss der CaMKII auf das erhöhte SR Ca²⁺-Leck in besonderem Maße verdeutlicht werden [91].

1.5.2 Arrhythmogene Effekte gesteigerter CaMKII-Aktivität

Wie die humane Herzinsuffizienz ist auch die CaMKII-induzierte Herzinsuffizienz mit einer erhöhten Arrhythmie-Anfälligkeit verbunden [8, 64]. Die Verstärkung des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks durch Hyperphosphorylierung des RyR2 wird auch dabei als wichtiger CaMKII-bedingter Pathomechanismus diskutiert. Diastolisch aus dem SR leckendes Ca^{2+} wird über den NCX nach extrazellulär eliminiert. Da im Austausch mit einem doppelt positiv geladenen Ca^{2+} -Ion drei Na^{+} -Ionen nach intrazellulär befördert werden, kommt es zu einem transienten Einwärtsstrom (I_{Ti}), welcher die Zellmembran depolarisiert. Wenn diese Depolarisation den Schwellenwert zur Öffnung der spannungsabhängigen Na^{+} -Kanäle erreicht, wird ein Aktionspotenzial ausgelöst und es kommt zu einer späten Nachdepolarisation („*delayed afterdepolarization*“, DAD) mit Potenzial zur Arrhythmie-Induktion [10, 107]. Dieser Mechanismus ist dabei nicht auf Herzinsuffizienz-assoziierte Arrhythmien beschränkt. DADs begünstigen ebenfalls ein Vorhofflimmern und werden auch bei dieser Arrhythmieform durch eine CaMKII-bedingte Hyperphosphorylierung des RyR2 mit gesteigertem diastolischen SR Ca^{2+} -Leck verursacht [9, 97].

Die CaMKII könnte über weitere Mechanismen an der Arrhythmogenese beteiligt sein: Bei erhöhter Aktivität der Proteinkinase wurde ein verstärktes Auftreten von frühen Nachdepolarisationen („*early afterdepolarization*“, EAD) beobachtet [8, 108]. Während DADs nach vollständiger Repolarisation der Zellmembran auftreten, handelt es sich bei EADs um depolarisierende Oszillationen des Aktionspotenzials während der Repolarisationsphase. EADs werden ebenfalls als Arrhythmie-Korrelate gewertet und u. a. mit Long-QT-Arrhythmien in Verbindung gebracht [109]. Eine Zunahme von EADs scheint mit einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in Verbindung zu stehen, welcher durch die Aktivität der CaMKII gefördert wird [108, 110]. Zusätzlich könnte die CaMKII-bedingte Phosphorylierung von spannungsabhängigen Na^{+} -Kanälen [64] und der Einfluss der CaMKII auf kardiomyozytäre K^{+} -Kanäle [65] ein vermehrtes Auftreten von EADs begünstigen und zur Induktion von Arrhythmien beitragen.

1.6 CaMKII-Inhibition als neuartige Therapieoption bei Herzinsuffizienz und Arrhythmien

Der Zusammenhang von gesteigerter Aktivität der CaMKII und pathophysiologischen Modifikationen bei Herzinsuffizienz und Arrhythmien legt nahe, dass die Inhibition dieser

Proteinkinase einen positiven Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf dieser Erkrankungen haben könnte. Tatsächlich präsentieren bereits zahlreiche Studien unterstützende Daten zu einer möglichen therapeutischen CaMKII-Inhibition, wie im Folgenden dargestellt wird.

Sowohl der fehlende Einfluss der CaMKII im CaMKII δ -Knockout-Modell [111] als auch eine dauerhafte Expression des CaMKII-Inhibitors AC3-I in einem weiteren genetisch veränderten Mausmodell [112] führten unter Herzinsuffizienz-induzierenden Belastungen zu einer Verminderung von Herzhypertrophie und kardialen Remodelling. Sossala et al. (2010) konnten positive Effekte einer akuten CaMKII-Inhibition für humanes insuffizientes Myokard demonstrieren. Ventrikuläre Muskelstreifen zeigten nach CaMKII-Inhibition durch KN-93 eine verbesserte Kontraktilität mit gesteigerter Kraft-Frequenz-Beziehung [6]. Das Potenzial zur Induktion von Arrhythmien konnte in isolierten Kardiomyozyten durch die Inhibition der CaMKII bei Herzinsuffizienz [8, 110] und bei Vorhofflimmern [97] verringert werden. Das Auftreten von arrhythmogenen frühen [110] und späten [97] Nachdepolarisationen verminderte sich nach CaMKII-Inhibition. In CaMKII-überexprimierenden Mäusen konnte sogar in vivo eine Reduktion von kardialen Arrhythmien durch CaMKII-Inhibition nachgewiesen werden [8]. Als entscheidender Pathomechanismus kann die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 nach CaMKII-bedingter Hyperphosphorylierung durch die Inhibition der CaMKII deutlich reduziert werden. Zahlreiche Untersuchungen konnten in unterschiedlichen Herzinsuffizienz-Modellen eine Reduktion des SR Ca²⁺-Lecks und eine Erhöhung des SR Ca²⁺-Gehalts nach CaMKII-Inhibition nachweisen [6, 8, 87, 106].

Die Inhibition der CaMKII stellt damit eine vielversprechende therapeutische Option für die Behandlung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien dar. Bisher fehlt es jedoch an geeigneten Substanzen für den klinischen Gebrauch [11].

1.6.1 Eigenschaften und Limitationen etablierter CaMKII-Inhibitoren

Der CaMKII-Inhibitor KN-93 wurde bisher für Studien auf zellulärer Ebene und in vivo am Häufigsten eingesetzt [11]. Mit dem strukturverwandten KN-62 [113] gehört KN-93 [114] zur Gruppe der allosterischen Inhibitoren, die über Konkurrenz an der Ca²⁺-Calmodulin-Bindungsstelle wirken (Abbildung 1-4). Diese Gruppe von Inhibitoren ist damit jedoch nicht in der Lage die Funktion der bereits aktivierten CaMKII zu inhibieren [113, 114]. Auch eine autonome Daueraktivität der CaMKII nach Autophosphorylierung, Oxidation durch ROS oder O-GlycNAcylation kann durch diese Substanzen damit vermutlich nicht unterbunden werden,

wodurch ihr klinisches Potenzial deutlich eingeschränkt wird. Für die CaMKII-Inhibition durch KN-93 wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 1 - 4 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt [11]. Gegenüber anderen Proteinkinasen wie der PKA weisen die allosterischen Inhibitoren eine hohe CaMKII-spezifische Selektivität auf [113, 114]. Allerdings zeigte KN-93 unabhängig von der CaMKII-Aktivität einen inhibitorischen Effekt auf L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle [110] und zahlreiche spannungsabhängige K^{+} -Kanäle [115], was Untersuchungen in Bezug auf den Ca^{2+} -Haushalt und Arrhythmien beeinträchtigen und Off-Target-Effekte bei klinischer Anwendung verursachen könnte [11].

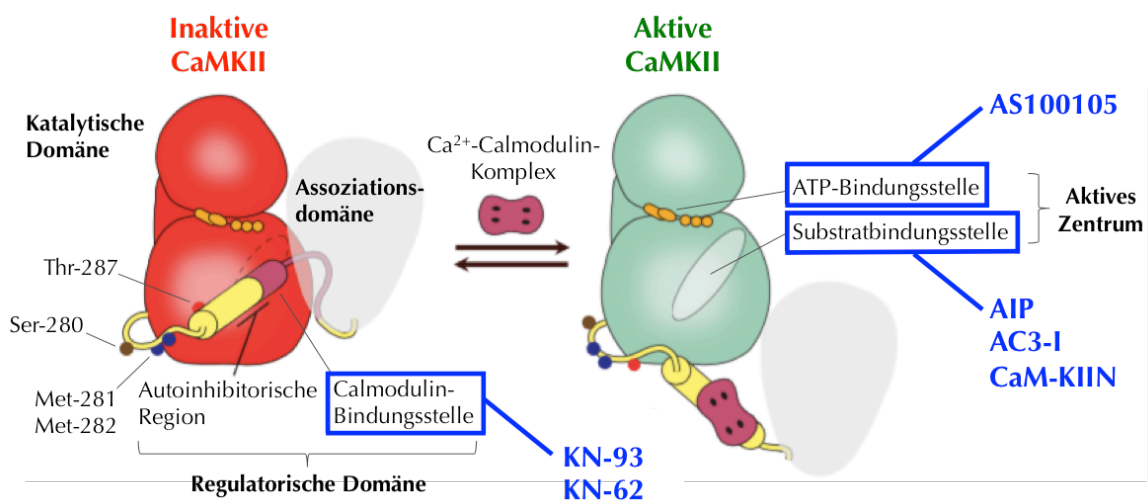


Abbildung 1-4: Angriffspunkte wichtiger CaMKII-Inhibitoren

Die allosterischen Inhibitoren KN-93 und KN-62 verhindern durch Konkurrenz mit dem Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex die Aktivierung der CaMKII. Im Gegensatz dazu können Peptidinhibitoren (AIP, AC3-I), Inhibitoren aus der CaM-KIIN-Gruppe und der neuartige CaMKII-Inhibitor AS100105 auch die bereits aktivierte CaMKII hemmen. AIP, AC3-I und CaM-KIIN wirken im Bereich der Substratbindungsstelle, die im inaktiven Zustand von der regulatorischen Domäne der CaMKII verdeckt wird. AS100105 verhindert die Bindung von ATP an das aktive Zentrum der CaMKII. Abbildung nach Pellicena und Schulman 2014 [11] mit freundlicher Genehmigung durch die Autoren.

Die Peptidinhibitoren AIP und AC3-I wirken kompetitiv an der Substratbindungsstelle der CaMKII [11] und hemmen so effektiv auch die bereits aktivierte CaMKII. Je nach Untersuchungsbedingungen konnte für AIP entsprechend eine 50- bis 500-fach verstärkte inhibitorische Potenz gegenüber KN-93 nachgewiesen werden [116]. Ein limitierender Faktor für den Einsatz der Peptidinhibitoren ist ihre fehlende Membrangängigkeit [117], welche jedoch durch Myristoylierung der Substanzen teilweise überwunden werden konnte. Es ist jedoch zu beachten, dass durch derartige Modifikationen negative Einflüsse auf die Selektivität der Inhibitoren entstehen könnten [11]. So wurden bereits CaMKII-unabhängige Effekte für myristoyliertes AIP nachgewiesen [118]. Die fehlende orale Bioverfügbarkeit der Peptidinhibitoren schränkt zudem ihre klinische Anwendung stark ein [11].

CaM-KIIN bezeichnet eine Gruppe kleiner endogener Proteine, die ausschließlich an die aktivierte Form der CaMKII binden. Ihr Wirkort scheint daher ein Bereich der katalytischen Domäne der CaMKII zu sein, der im inaktiven Zustand von der autoinhibitorischen Domäne blockiert wird. Der inhibitorische Effekt entfaltet sich damit sowohl nach Bindung des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes als auch nach autonomer Aktivierung der CaMKII [119]. Die Anwendung dieser Inhibitoren kann gentechnisch durch lokale Applikation von adenoviralen Konstrukten erfolgen, wodurch eine regional selektive Enzym-Inhibition erzielt werden kann. Bisher ist die biologische Funktion der CaM-KIIN jedoch nicht vollständig verstanden, so dass zahlreiche CaMKII-unabhängige Effekte vorstellbar sind. [11]

Keine der hier beschriebenen Substanzen wurde für den therapeutischen Einsatz konzipiert oder in Hinblick auf Potenz, Selektivität und Pharmakokinetik für eine medikamentöse Anwendung optimiert. Die Entwicklung neuer selektiver CaMKII-Inhibitoren für eine sichere und effektive Anwendung zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen ist daher nötig. Zugleich könnten optimierte CaMKII-Inhibitoren verbesserte Testsubstanzen für die voranschreitende CaMKII-Forschung liefern. [11]

1.6.2 AS100105, ein neuartiger ATP-kompetitiver CaMKII-Inhibitor

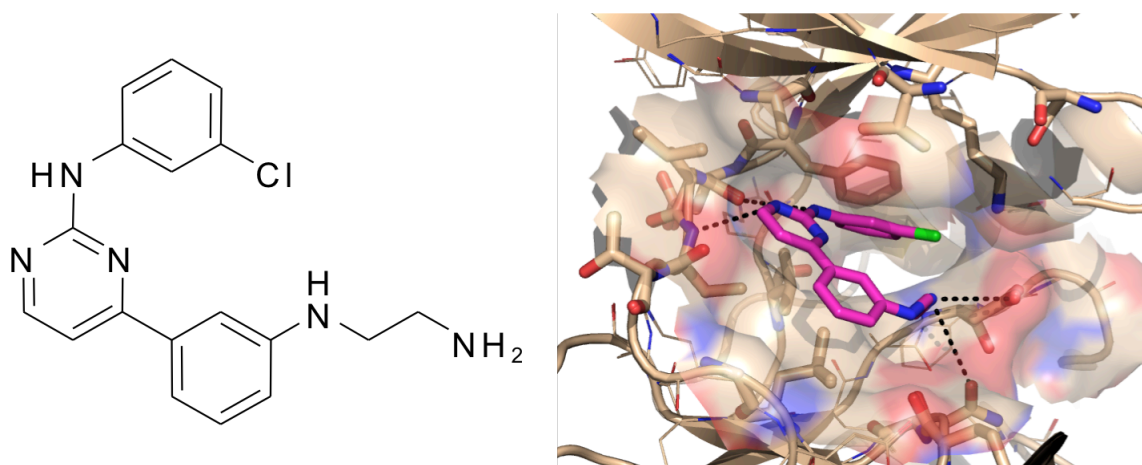


Abbildung 1-5: AS100105 wirkt inhibitorisch am aktiven Zentrum der CaMKII δ C

Strukturformel des Pyrimidin-basierten CaMKII-Inhibitors AS100105 (links) und ComputermodeLL seiner Bindung im Bereich der ATP-Bindungsstelle des aktiven Zentrums der humanen CaMKII δ C (rechts). Abbildung mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt von Howard Schulman.

AS100105 (in der Literatur auch in seiner Kurzbezeichnung AS105 genannt) ist Lead-In-Substanz einer neuen Generation von CaMKII-Inhibitoren, deren Zielsetzung eine medikamentöse Anwendung an Patientinnen und Patienten ist [11]. Die Substanz wurde durch computerbasierte Optimierung von Pyrimidin-basierten CaMKII δ C-Inhibitoren generiert und konkurriert hochaffin mit ATP um die Bindung an das aktive Zentrum der CaMKII

(Abbildung 1-5), wodurch die Phosphorylierung der CaMKII-Zielproteine unterbunden wird [120]. Die Inhibitionskonstante (K_i) von 3 nmol/l sollte die Effektivität des neuartigen CaMKII-Inhibitors sogar bei millimolaren ATP-Konzentrationen, wie sie in Kardiomyozyten vorzufinden sind, gewährleisten. AS100105 unterscheidet sich durch den Wirkmechanismus an der ATP-Bindungsstelle von bisher etablierten CaMKII-Inhibitoren (Abbildung 1-4) und kann dadurch einige ihrer Limitationen umgehen. So erfolgt die Inhibition der CaMKII durch AS100105, wie in Abbildung 1-6 dargestellt, unabhängig vom Autophosphorylierungsstatus des Enzyms. Im Gegensatz zum allosterischen CaMKII-Inhibitor KN-93 vermag AS100105 damit die CaMKII sowohl nach Ca^{2+} -Calmodulin-bedingter Aktivierung als auch bei autonomer Aktivität nach Autophosphorylierung zu inhibieren [121]. Dies impliziert zudem eine Wirksamkeit der Substanz nach ROS-bedingter Oxidation oder GlycNAcylation der CaMKII (vgl. 1.3.2).

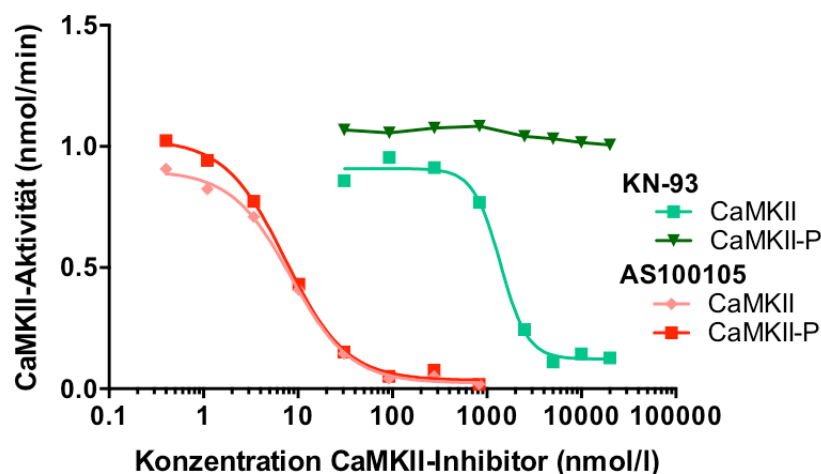


Abbildung 1-6: AS100105 inhibiert die CaMKII unabhängig vom Autophosphorylierungszustand

Im Gegensatz zum allosterischen CaMKII-Inhibitor KN-93 (grün) ist AS100105 (rot) aufgrund seiner kompetitiven Wirkung an der ATP-Bindungsstelle in der Lage sowohl die nicht-autophosphorylierte (CaMKII) als auch die autophosphorylierte CaMKII (CaMKII-P) zu hemmen. Mit einer IC_{50} von 8 nmol/l verfügt AS100105 zudem über eine deutlich höhere Potenz als KN-93 (1 - 4 $\mu\text{mol/l}$). Abbildung nach Neef et al. 2018 [121] mit freundlicher Genehmigung durch die Autoren.

Dabei weist AS100105 mit einer IC_{50} von 8 nmol/l eine sehr hohe Potenz auf [121], was die Vermutung nahelegt, dass eine Inhibition der CaMKII am aktiven Zentrum im Vergleich zur allosterischen Hemmung die effektivere Form der Unterdrückung der Enzymfunktion darstellt. Die hohe Potenz und die Inhibition der CaMKII unabhängig von ihrem Aktivierungsmodus machen AS100105 zu einer vielversprechenden Lead-In-Substanz für eine klinische Anwendung. Außerhalb von In-vitro-Experimenten wurden die Effekte von AS100105 jedoch bislang noch nicht untersucht.

1.7 Zielsetzung und Fragestellung

Der Inhibition der CaMKII wird ein großes Potenzial zur Behandlung von Herzinsuffizienz [104] und kardialen Arrhythmien [10] zugeschrieben. Als reine Forschungssubstanzen eignen sich die etablierten CaMKII-Inhibitoren nicht für den medikamentösen Einsatz. Der ATP-kompetitive CaMKII-Inhibitor AS100105 zählt zur ersten Generation von Wirkstoffen, die speziell mit der Zielsetzung einer therapeutischen Anwendung entwickelt wurden [11]. In der vorliegenden Arbeit sollen erstmals wichtige Auswirkungen dieses neuartigen CaMKII-Inhibitors auf die elektromechanische Kopplung experimentell erfasst werden. Zugleich sollen erste Einblicke in das therapeutische Potenzial von AS100105 bei Herzinsuffizienz und Arrhythmien gewonnen werden.

Konkret sollen hierfür insbesondere folgende Teilaspekte untersucht werden:

Welche Effekte ergeben sich durch die akute CaMKII-Inhibition mit AS100105 in isolierten Kardiomyozyten in Bezug auf ...

- 1) ... die Kontraktilität und das Relaxationsverhalten?
- 2) ... das diastolische SR Ca^{2+} -Leck?
- 3) ... die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit und den Ca^{2+} -Gehalt des SR?
- 4) ... arrhythmogene SR Ca^{2+} -Freisetzungseignisse?

2 Material und Methoden

2.1 Kardiomyozytenisolation und Ca^{2+} -Aufbau

Die Auswirkungen der CaMKII-Inhibition durch AS100105 wurden an isolierten murinen und humanen Kardiomyozyten untersucht. Dazu wurden Ca^{2+} -arme Isolationslösungen verwendet. Die Ca^{2+} -Konzentration für die Messungen an den isolierten Kardiomyozyten betrug bei allen Versuchen 2 mmol/l. Um eine Schädigung der Zellen durch einen raschen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration zu vermeiden, wurden sie nach der Isolation einem schrittweisen Ca^{2+} -Aufbau unterzogen.

2.1.1 Isolation muriner Kardiomyozyten

Die untersuchten murinen Herzmuskelzellen stammten von transgenen CaMKII δ_{C} -überexprimierenden Mäusen (vgl. 1.5). Vor der Isolation einzelner Kardiomyozyten wurde das Herz gewogen, um das relative Herzgewicht der Tiere zu errechnen und dieses mit entsprechenden Wildtyp-Geschwistertieren zu vergleichen:

$$\text{Relatives Herzgewicht (mg/g)} = \frac{\text{Herzgewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}}$$

Zur Isolierung der Herzmuskelzellen wurden die Tiere zunächst mit Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Das Herz wurde herauspräpariert und anschließend in einer Langendorff-Perfusionsanlage kanüliert und retrograd über die Aorta bei 36,5 °C perfundiert. Um Blut und Ca^{2+} auszuwaschen, erfolgte die Perfusion zunächst für ca. drei bis vier Minuten mit reiner Ca^{2+} -armer Perfusionslösung. Danach wurde je nach Herzgröße weitere fünf bis sieben Minuten lang kollagenasehaltige Perfusionslösung verwendet, um den bindegewebigen Zellverbund aufzulösen. Nach dem Verdau wurden die Ventrikel abgetrennt, in einer vorgewärmten Petrischale mit Enzymlösung zerkleinert und nach Hinzugabe von 2,5 ml Stopplösung durch ein Nylongaze (200 μm Porengröße) in ein 50 ml Röhrchen gefiltert. Weitere Details sowie die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen finden sich in Neef et al. 2013 [122]. Diese Arbeitsschritte erfolgten allesamt durch Biologisch-technische Assistentinnen und Assistenten.

Für jeden Schritt des anschließenden Ca^{2+} -Aufbaus wurde eine siebenminütige Sedimentationszeit abgewartet, in der sich ein Zellpellet am Boden des Röhrchens absetzte. Der zellarme Überstand wurde danach abpipettiert und verworfen. Die isolierten Kardiomyozyten wurden in 15 ml Röhrchen nacheinander Ca^{2+} -Lösungen ansteigender Stoffmengenkonzentration von 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 und 1,3 mmol/l ausgesetzt. Die Ca^{2+} -Messkonzentration von 2 mmol/l wurde erst durch Inkubation der Zellen mit einer Fluoreszenzfarbstofflösung erreicht (vgl. 2.2.3).

2.1.2 Isolation humaner Kardiomyozyten

Das humane atriale Herzmuskelgewebe stammte von Patientinnen und Patienten aus dem zentralen OP-Bereich der Universitätsmedizin Göttingen, bei denen während einer Herzoperation im Rahmen des Anschlusses an die Herz-Lungen-Maschine Vorhofgewebe entfernt wurde. Die Gewebespenderrinnen und Gewebespendere hatten hierfür explizit schriftlich eingewilligt. Es lag ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen vor (Az. 14/9/11). Sämtliche Versuche und Auswertungen erfolgten mit pseudonymisierten Proben, so dass die Anonymität der Patientinnen und Patienten gewahrt wurde.

Zum Transport des entnommenen Herzmuskelgewebes in das Versuchslabor wurde eine eisgekühlte Kardioplegie-Lösung verwendet. Im Labor wurde das Gewebe in eine Präparierschale mit Ca^{2+} -freier Isolationslösung überführt und in kleine Stücke geschnitten. Um einzelne Kardiomyozyten aus dem Zellverband zu lösen, wurden die Gewebestückchen für 45 Minuten unter beständigem Rühren mit einer kollagenase- und proteasehaltigen Enzymlösung in Kontakt gebracht und in einem zweiten Schritt für 20 Minuten durch Kollagenase weiterverdaut. Der Inhalt des Rührgeräts wurde anschließend durch ein Sieb mit einer Porengröße von 300 μm filtriert und das Filtrat bei 95 g (780 rpm, 140 mm Radius) zehn Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das abzentrifugierte Pellet in Feng-Medium resuspendiert. Es folgte analog zur Isolation muriner Kardiomyozyten ein mehrschrittiger Ca^{2+} -Aufbau durch Zugabe von Ca^{2+} -Lösung einer Stoffmengenkonzentration von 10 mmol/l. Bei jeweils siebenminütiger Adaptationszeit wurden die isolierten Zellen vorsichtig höheren Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,2, 0,3, 0,5, und 0,75 mmol/l ausgesetzt. Weitere Details zur Isolation der humanen atrialen Kardiomyozyten inklusive der Zusammensetzung der verwendeten Lösungen finden sich in Voigt et al. 2010 [123]. Diese Arbeitsschritte wurden allesamt von Biologisch-technischen Assistentinnen und Assistenten

ausgeführt. Weitere Schritte des Ca^{2+} -Aufbaus erfolgten für humane Kardiomyozyten durch die Farbstoffinkubation (1 mmol/l) und das Einwaschen der Basislösung für humane Zellen (2 mmol/l) unmittelbar vor der Messung (vgl. 2.4.2.1).

2.2 Allgemeine Vorbereitungen für die Messungen

Im Folgenden wird die grundlegende Vorgehensweise für die Vorbereitungen aller Versuchsreihen vorgestellt. Versuchsspezifische Abweichungen und Details werden in den Unterkapiteln 2.3.2.1, 2.3.3.1 und 2.4.2.1 erläutert.

2.2.1 Messkammern

Die mikroskopische Untersuchung der isolierten Kardiomyozyten erfolgte in speziellen Messkammern. Die Abmessungen der Messkammern waren passend zu entsprechenden Aussparungen am Objektisch der verwendeten Mikroskope konzipiert. Zur Anfertigung wurde die Unterseite eines kleinen rechteckigen Kunststoffrahmens mit einem Deckgläschen flüssigkeitsdicht verklebt. Das Deckgläschen am Boden der Kammern diente dabei als Objektträger. Um ein Anheften der isolierten Kardiomyozyten am Kammerboden zu ermöglichen, wurde das Deckgläschen an der befüllbaren Oberseite der Kammer gleichmäßig mit einer dünnen Schicht Laminin bestrichen und es wurden pro Kammer jeweils 400 µl der gewonnenen Zellsuspension aufgetragen. Danach schloss sich je nach Zellart eine 15- (murine Zellen) bzw. 45-minütige (humane Zellen) manipulationsfreie Ruhezeit an, welche der Sedimentation der Kardiomyozyten auf den Boden der Kammer diente.

2.2.2 CaMKII-Inhibitor AS100105

Der neuartige CaMKII-Inhibitor AS100105 wurde von Prof. Howard Schulman (Stanford University/Stanford/USA sowie Allosteros Therapeutics Inc./Sunnyvale/USA) zur Verfügung gestellt. Die zugesandten Proben wurden zur Herstellung einer Stammlösung mit einer Inhibitor-Konzentration von 2 mmol/l verwendet. Pro 1 mg der Substanz wurden dafür 1,49 ml 0,9-prozentiger NaCl-Lösung hinzugegeben. Zur besseren Löslichkeit wurden pro 1 ml der entstandenen Lösung 6,25 µl 1-molarer HCl-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde durch Vortexen für 15 Minuten durchmischt und dabei kurzzeitig auf 40 °C erwärmt. Die hergestellte Inhibitorstammlösung wurde zu 0,1 ml aliquotiert und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffe

Elektronen einer fluoreszierenden Substanz können durch Licht einer bestimmten Wellenlänge kurzzeitig in einen höheren Energiezustand versetzt werden. Fällt ein Elektron wieder in seinen stabilen energiearmen Zustand zurück wird die Energie in Form von Licht emittiert. Das Emissionslicht ist dabei energieärmer und damit langwelliger als das Anregungslicht, da nicht die gesamte gespeicherte Energie in Form von Licht abgegeben wird. Zu den spezifischen Eigenschaften eines Fluoreszenzfarbstoffs zählt die Wellenlänge des Absorptions- und Emissionsmaximums.

Bei den Experimenten zu dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-3 und Fluo-4 verwendet. Die Farbstoffe wurden als Azetoxymethylester Fluo-3-AM und Fluo-4-AM in Form von 50 μl Stammlösungen geliefert. Das Ansetzen einer Färbelösung mit einer Farbstoffkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ erfolgte in einer mit Rotlicht beleuchteten Dunkelkammer. Zunächst wurde die jeweilige Farbstoff-Stammlösung in 44,44 μl DMSO gelöst. Anschließend wurden 5 μl der entstandenen Lösung sowie 1 μl einer 20-prozentigen Lösung von Pluronic F-127 mit 500 μl der jeweiligen Basislösung für murine bzw. humane Zellen durch gründliches Vortexen vermischt. Je ein befülltes 0,5 ml Eppendorfgefäß konnte zur Inkubation von zwei Messkammern mit jeweils 250 μl Farbstofflösung verwendet werden. Bis zur Verwendung wurde die Gebrauchslösung lichtgeschützt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Farbstoffinkubation der Messkammern diente zugleich als weiterer Schritt des Ca^{2+} -Aufbaus (vgl. 2.1) und erfolgte ebenfalls in der Dunkelkammer. Nach Ablauf der Sedimentationszeit wurde der Überstand der Isolationssuspension vorsichtig mithilfe von saugfähigem Zellstoff entfernt, um anschließend 250 μl Farbstofflösung zuzugeben. Die Farbstoffinkubation dauerte je nach Versuchsreihe 12 bis 30 Minuten (siehe unten). Während dieser Zeit wurden die Messkammern lichtundurchlässig abgedeckt.

In Form des lipophilen Ca^{2+} -insensitiven Azetoxymethylesters Fluo-3-AM bzw. Fluo-4-AM kann der Farbstoff die Zellmembran der Kardiomyozyten passieren und in das Zytosol übertreten. Hydrolyse durch ubiquitäre intrazelluläre Esterasen spaltet dort den Azetoxymethylrest ab und setzt den polaren Farbstoff frei, der in dieser nun membranimpermeablen Form im Zytosol verbleibt. Die Farbstoffe bilden selektiv einen Chelatkomplex mit Ca^{2+} -Ionen und erlangen dadurch ihre fluoreszierenden Eigenschaften, während sie in Abwesenheit von Ca^{2+} nahezu nichtfluoreszierend sind. Veränderungen der

zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration können so semiquantitativ als Änderungen der Intensität des Fluoreszenzlichts aufgezeichnet werden. [124]

2.2.4 Superfusionslösungen

Zu Beginn jeder Messung wurden die Kardiomyozyten über ein Superfusionssystem mit Lösungen umspült, die Elektrolyte in physiologischer Zusammensetzung enthielten. Die Bestandteile der Basislösungen für murine und humane Zellen unterschieden sich dabei leicht voneinander (Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2). Je nach Messprotokoll wurden im Verlauf der Versuche gegebenenfalls weitere Superfusionslösungen verwendet.

Tabelle 2-1: Basislösung für murine Zellen

Substanz	Molarität (mmol/l)	Molgewicht (g/mol)	Masse (g)
KCl	4	74,56	0,2982
NaCl	140	58,44	8,182
MgCl_2	1	95,21	0,0952
HEPES	5	238,31	1,192
Glucose	10	180,16	1,802
CaCl_2	2	110,99	0,22198
Gesamtvolumen 1000 ml mit ddH ₂ O; pH 7,4 bei RT mit NaOH; Lagerung bei 4 °C			

Tabelle 2-2: Basislösung für humane Zellen

Substanz	Molarität (mmol/l)	Molgewicht (g/mol)	Masse (g)
KCl	4	74,56	0,2982
NaCl	136	58,44	7,984
MgCl_2	1,6	95,21	0,152
HEPES	10	238,31	2,383
NaH_2PO_4	0,33	137,99	0,046
NaHCO_3	4	84,01	0,336
Glucose	10	180,16	1,802
CaCl_2	2	110,99	0,22198
Isoprenalin	0,00001	211,26	0,00000211
Gesamtvolumen 1000 ml mit ddH ₂ O; pH 7,4 bei RT mit NaOH; Lagerung bei 4 °C; Verwendung von lichtgeschützten Behältern und Superfusionssystemen			

Es wurden jeweils Vorratslösungen mit einem Volumen von 1000 ml angesetzt. Als wässriger Anteil wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet. Die verwendeten Chemikalien wurden mit einer Feinwaage (Quintix124-1S, Sartorius/Göttingen/Deutschland) abgewogen. In der Flüssigkeit gelöst wurden die Substanzen mithilfe eines heizbaren Magnetrührers (IKAMAG RCT, IKA/Staufen/Deutschland). Unter Verwendung eines Basic pH-Meters PB-11 (Sartorius/Göttingen/Deutschland) wurde der pH-Wert jeweils bei Raumtemperatur (RT) mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Bis zur Verwendung wurden die Vorratslösungen bei 4 °C gelagert.

2.2.5 Festlegung von Inhibitor- und Kontrollgruppe

Für die Versuchsreihen wurden jeweils zwei Messgruppen gebildet. In der Inhibitorgruppe (Abkürzung: AS) wurden unter Verwendung der Stammlösung des CaMKII-Inhibitors alle Farbstoff- und Superfusionslösungen mit AS100105 in der Messkonzentration von 2 µmol/l versetzt. Um unspezifische Effekte durch Lösungsmittel zu verhindern, wurden in der Kontrollgruppe als „Vehikel“ in gleicher Konzentration alle Substanzen beigelegt, die für die Aufbereitung des Inhibitors erforderlich waren (vgl. 2.2.2). Die Zellen wurden während der Messungen mit den jeweiligen Superfusionslösungen umspült. Messungen der Kontrollgruppe und der Inhibitorgruppe wurden an einem Messtag im Wechsel in einer festgelegten Abfolge durchgeführt („ABBAABBA...“). Innerhalb der Versuchsreihen wurde die zuerst gemessene Gruppe an jedem neuen Messtag alterniert („BAABBAAB...“).

2.2.6 Vorbereitungen am Mikroskop

Nach der Farbstoffinkubation wurde eine Messkammer in die entsprechende Halterung am Objektisch platziert. Der Zulauf der Superfusion und eine mit einer Pumpe (Masterflex, Cole-Parmer/Vernon Hills/USA) verbundene Absaugvorrichtung wurden so an der Messkammer platziert, dass ein möglichst konstanter Badspiegel gewährleistet wurde. In der Kammer wurde eine Feldstimulationselektrode platziert, welche mit einem elektrischen Stimulator (MyoPacer, IonOptix/Milton/USA) verbunden war, der eine Stimulation mit verschiedenen Frequenzen ermöglichte. Für alle Versuche wurde eine Spannung von 20 mV eingestellt. Vor Beginn der Messungen wurde jede neue Kammer für fünf Minuten mit der jeweiligen Basislösung perfundiert, um etwaige nicht fixierte Farbstoffreste auszuwaschen und dem in die Zellen inkubierten Farbstoff Zeit zur vollständigen Lösung aus der Esterbindung zu geben. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3 Epifluoreszenzmikroskopische Messung muriner Kardiomyozyten

Die Versuche zur Untersuchung der elektromechanischen Kopplung (vgl. 2.3.2) und des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks (vgl. 2.3.3) in murinen Kardiomyozyten wurden an einem Epifluoreszenzsystem (IonOptix/Milton/USA) durchgeführt. Darin integriert war ein inverses Mikroskop Eclipse TE2000-U mit 40-fach vergrößerndem Öl-Immersionsobjektiv (Nikon/Tokio/Japan).

2.3.1 Funktionsprinzip der Messung

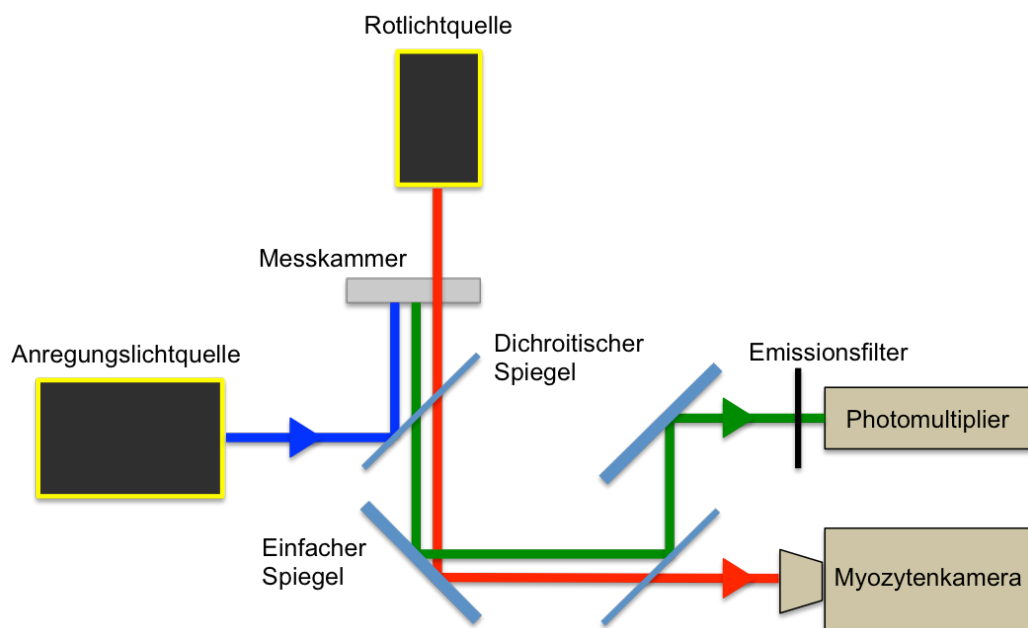


Abbildung 2-1: Strahlengang bei der Messung am Epifluoreszenzmikroskop

Durch optische Filter und ein System einfacher und dichroitischer Spiegel wird die Aufspaltung von Lichtwellen in unterschiedliche Wellenlängenbereiche sowie deren separate Registrierung ermöglicht. Die Kardiomyozyten in der Messkammer wurden mit Anregungslicht (blau) einer Wellenlänge von 480 ± 15 nm bestrahlt. Das emittierte Fluoreszenzlicht (grün) einer Wellenlänge von 535 ± 20 nm gelangte zum Photomultiplier. Das Licht einer Rotlichtlampe (rot) mit Wellenlängen oberhalb von 695 nm diente zur Aufnahme der Zellen mit der Myozytenkamera.

Unter Verwendung des Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-4 erfolgte in den farbstoffinkubierten Kardiomyozyten die semiquantitative Messung der Ca^{2+} -Konzentration. Die Durchführung geeigneter Messprotokolle ermöglichte es dabei, Rückschlüsse auf den Ca^{2+} -Haushalt der Zellen zu treffen. Simultan konnte über eine integrierte Kamera (MyoCam-S, IonOptix/Milton/USA), an welche das Durchlicht-Bild des Mikroskops weitergeleitet wurde, mittels einer Bildanalysesoftware die Sarkomerlänge der Kardiomyozyten kontinuierlich gemessen werden. Unter dem Mikroskop wurde jeweils eine intakte, rhythmisch schlagende Herzmuskelzelle in der Messkammer aufgesucht und fokussiert. Als Lichtquelle für die Fluoreszenz-Messung diente eine Xenon-Bogenlampe (UXL-75XE, Ushio/Tokio/Japan).

Durch optische Filter wurde ausschließlich Licht einer für Fluo-4 geeigneten Anregungswellenlänge von 480 ± 15 nm über einen Lichtleiter in das Mikroskop übertragen und auf die Zellen projiziert. Die Aufzeichnung der emittierten Ca^{2+} -Fluoreszenz erfolgte über einen Photomultiplier (IonOptix/Milton/USA) mit vorgeschaltetem Emissionsfilter (Chroma Technology Corp/Vermont/USA) für Wellenlängen von 535 ± 20 nm, wodurch das anregende Licht und das Durchlicht (Wellenlänge > 695 nm) ausgeblendet sowie Streulicht möglichst minimiert wurde. Der Photomultiplier verstärkte das empfangene Lichtsignal, wandelte es in elektrische Information um und leitete diese zur Aufzeichnung an einen Computer weiter. Die Aufzeichnung der Signale und Ansteuerung der Geräte erfolgte anhand der Software IonWizard 5.0 (IonOptix/Milton/USA).

Um die untersuchten Zellen mit der Myozytenkamera aufzuzeichnen, wurden sie mit einer Rotlichtlampe durchleuchtet. Ein optischer Filter (Chroma Technology Corp/Vermont/USA) ließ nur Licht einer Wellenlänge oberhalb von 695 nm passieren, so dass es zu keiner Beeinflussung der Ca^{2+} -Fluoreszenz-Messungen kam. Über ein System einfacher und dichroitischer Spiegel (Chroma Technology Corp) gelangte dieses Lichtsignal getrennt vom Fluoreszenzlicht zur Myozytenkamera (Abbildung 2-1). Im Computerprogramm IonWizard wurde das Bildsignal dargestellt. Durch Drehung der Kamera wurde die jeweils fokussierte Kardiomyozyte im Sichtfenster des Programms für die Messung ausgerichtet. Mithilfe von Blenden wurde das Bild auf die ausgewählte Zelle beschränkt, um den Einfluss umliegender Zellen auf die Fluoreszenz-Messung zu minimieren. Innerhalb der Zelle wurde ein rechteckiges Fenster mit möglichst harmonisch verlaufender Sarkomerstruktur markiert. In diesem Bereich erfolgte die Bildanalyse zur Messung der Sarkomerlänge.

2.3.2 Untersuchung der elektromechanischen Kopplung

Das verwendete Messprotokoll ermöglichte die Untersuchung des Ca^{2+} -Haushalts und der Kontraktilität der Kardiomyozyten bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen und lieferte Informationen zur Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit und Ca^{2+} -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums. Unter Verwendung von Kontroll- und Inhibitorgruppe sollte der Einfluss des CaMKII-Inhibitors AS100105 auf die elektromechanische Kopplung ermittelt werden.

2.3.2.1 Vorbereitung der murinen Kardiomyozyten und Messbedingungen

Für die Versuche zur elektromechanischen Kopplung wurden die Messkammern mit 1,5 μl Laminin beschichtet. Die Sedimentations- bzw. Fixationszeit der in die Messkammern

plattierten Zellen betrug 15 Minuten. Die anschließende Inkubationszeit mit Fluo-4-AM betrug ebenfalls 15 Minuten und stellte zugleich den letzten Schritt des Ca^{2+} -Aufbaus zum Erreichen der Ca^{2+} -Zielkonzentration von 2 mmol/l dar. Das Superfusionssystem wurde auf einen Fluss von 80 ml/min eingestellt. Vor Beginn der Messung wurde ein fünfminütiges Auswaschen des Fluoreszenzfarbstoffs abgewartet. Diese Zeit diente zugleich der Anpassung der Kardiomyozyten an die nun erfolgende elektrische Stimulation. Neben der Basislösung für murine Zellen erforderte das Messprotokoll die Vorbereitung einer Koffein-Lösung. Die in Tabelle 2-3 dargestellte Vorratslösung entsprach der Basislösung für murine Zellen mit Zusatz von 10 mmol/l Koffein.

Tabelle 2-3: Koffein-Lösung

Substanz	Molarität (mmol/l)	Molgewicht (g/mol)	Masse (g)
Koffein	10	194,2	1,942
Gesamtvolumen 1000 ml mit Basislösung für murine Zellen (Tabelle 2-1); pH 7,4 bei RT mit NaOH; Lagerung bei 4 °C			

Um eine schlagartige Superfusion der untersuchten Zelle mit der Koffein-Lösung zu ermöglichen und einen ungewollten Einfluss des Koffeins auf das vorherige Messprotokoll zu verhindern, wurde für die Koffein-Messungen jeweils erst unmittelbar vor der Koffein-Applikation der Zulauf eines separaten Superfusionssystems direkt an der Zelle platziert. Mittels eines Magnetschalters konnte hierüber ein schlagartiger Koffein-Puls auf die Zelle appliziert werden.

2.3.2.2 Messprotokoll

Zu Beginn der Messung wurden die Herzmuskelzellen in der Messkammer mit der Ausgangsfrequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert. Der infolge der Stimulation entstehende systolische Anstieg der Ca^{2+} -Fluoreszenz und deren diastolischer Abfall sowie die sich daraus ergebenden Kontraktionskurven wurden mit der IonWizard Software registriert (Abbildung 2-2). Es wurden konstante Amplituden des Ca^{2+} -Signals mit stabilen Kontraktionen („*steady state*“) abgewartet und hierunter mindestens 15 Transienten bzw. Kontraktionen aufgezeichnet. Die Stimulationsfrequenz wurde in der Folge zunächst auf 2 Hz und dann auf 3 Hz gesteigert. Nach jedem Frequenzwechsel wurde abgewartet, bis sich die Zelle erneut in einen Steady State äquilibriert hatte. Erst dann wurde zur nächsthöheren Frequenz gewechselt.

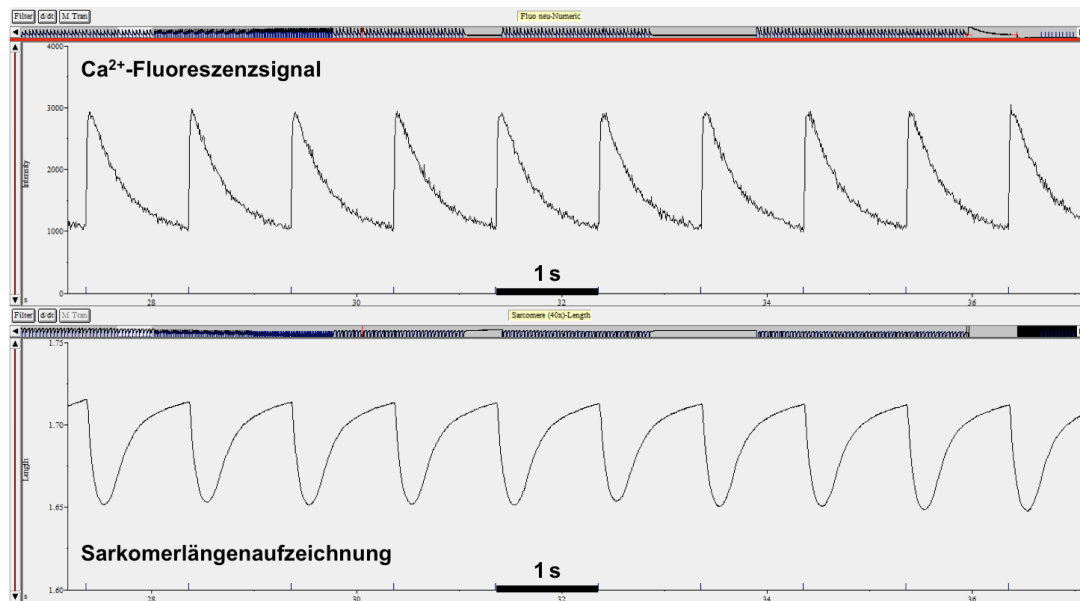


Abbildung 2-2: Messung bei Stimulationsfrequenz von 1 Hz

Die simultane Aufzeichnung des Ca²⁺-Fluoreszenzsignals und der Sarkomerlänge führte bei elektrischer Stimulation der Kardiomyozyten zur Registrierung von Ca²⁺-Transienten und Kontraktionskurven. Originalregistrierung aus dem Programm IonWizard mit erläuternden Einträgen.

Nach Rückkehr zur Ausgangsfrequenz von 1 Hz mit ausreichender Anpassungszeit wurde die elektrische Stimulation, wie in Abbildung 2-3 dargestellt, für zehn Sekunden pausiert und anschließend mit unveränderter Frequenz fortgeführt.

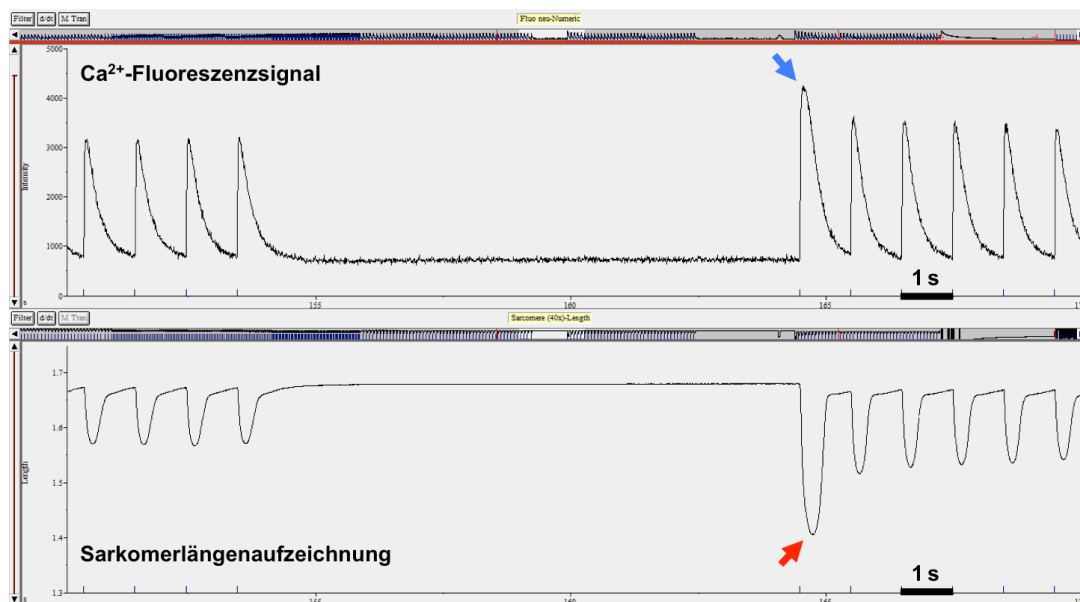


Abbildung 2-3: Messung bei zehnstündiger Stimulationspause

Der erste Ca²⁺-Transient (blauer Pfeil) und die erste Kontraktionskurve (roter Pfeil) nach Pausierung der elektrischen Stimulation waren entscheidend für die Auswertung der Post-Pausen-Zunahme (vgl. 2.3.2.3). Originalregistrierung aus dem Programm IonWizard mit erläuternden Einträgen.

Von Interesse war hier die Zunahme von Ca²⁺-Transienten-Amplitude und Kontraktionsamplitude der ersten auf die Pause folgenden Stimulation („Post-Pausen-Zunahme“) als Maß

für die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SRs. Es sei angemerkt, dass prinzipiell auch die Untersuchung einer 30-sekündigen Pause erfolgen sollte. Da aber bereits unter Kontrollbedingungen über 40 % der Zellen während der 30 Sekunden eine Spontan-contraktion zeigten, wurde hiervon Abstand genommen.

Nach erneutem Erreichen eines Steady State wurde die Applikation der Koffein-Lösung vorbereitet (vgl. 2.3.2.1). Eine Sekunde nach dem letzten Stimulationsimpuls wurde die Superfusion mit der Koffein-Lösung gestartet und solange fortgeführt, bis der hierdurch ausgelöste koffeininduzierte Ca^{2+} -Transient („Koffein-Transient“) wieder praktisch vollständig abgefallen war. Nach Abschluss des Messprotokolls wurde ein zellfreier Abschnitt direkt neben der untersuchten Herzmuskelzelle unter dem Mikroskop eingestellt, um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz aufzuzeichnen (Abbildung 2-4).

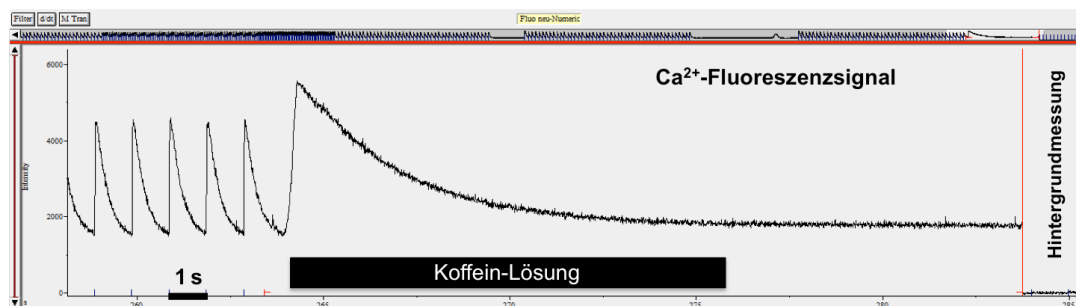


Abbildung 2-4: Messung bei Koffein-Applikation

Die Applikation von Koffein-Lösung eine Sekunde nach Beendigung der elektrischen Stimulation führte zur Aufzeichnung eines Koffein-Transients. Nach Abschluss des Messprotokolls wurde die Ca^{2+} -Hintergrundfluoreszenz gemessen. Originalregistrierung aus dem Programm IonWizard mit erläuternden Einträgen.

Pro Messkammer wurden mit diesem Protokoll durchschnittlich zwei bis drei Zellen gemessen. Zugunsten der Koffein-Messungen wurde zum Teil auf die Frequenzsteigerungen und die Stimulationspause verzichtet, um mehr Zellen pro Kammer messen zu können. Nach jeder Koffein-Applikation wurde eine Auswaschzeit von mindestens drei Minuten eingehalten, um die folgende Messung nicht durch Einwirkung von Koffein in der Messlösung zu beeinflussen.

2.3.2.3 Auswertung

Im Programm Ion Wizard 5.0 (IonOptix) erfolgte die mathematische Analyse relevanter Parameter der Ca^{2+} -Transienten (Abbildung 2-5) und Kontraktionskurven (Abbildung 2-6).

Zuerst wurde die jeweilige Hintergrundfluoreszenz von der Ca^{2+} -Fluoreszenzkurve eines aufgezeichneten Messdurchlaufs abgezogen. Von den Transienten bzw. Kontraktionen im Steady State wurden für jede Stimulationsfrequenz jeweils die Signale von mindestens zehn

Stimulationen gemittelt. Diese gemittelten Signale wurden mit IonWizard analysiert. Die hierbei ausgewerteten Parameter beschreiben die Amplitude des Transienten bzw. der Kontraktion sowie die Abfall- bzw. Relaxationskinetik. Für die Kontraktionen wurde zudem die diastolische Sarkomerlänge bestimmt.

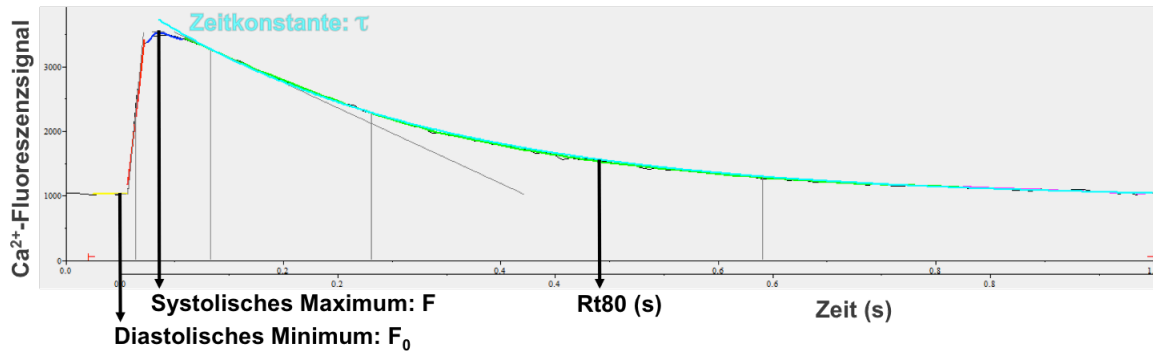


Abbildung 2-5: Ca²⁺-Transienten-Analyse

Analyse eines gemittelten Ca²⁺-Transients bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz. Aufzeichnung der Auswertung im Programm IonWizard mit erläuternden Einträgen.

Die Farbstoffe Fluo-3-AM und Fluo-4-AM ermöglichen die semiquantitative Bestimmung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Um den Einfluss unterschiedlich starker Farbstoffbeladungen der jeweiligen Kardiomyozyten auf das Fluoreszenzsignal herauszurechnen, wird bei Messungen mit diesen Farbstoffen die jeweilige maximale systolische Fluoreszenz F auf die diastolische Fluoreszenz F₀ normiert. Unter Annahme eines gleichen diastolischen Ca²⁺-Gehalts in den Zellen ist F₀ ein Maß für die Farbstoffbeladung der einzelnen Zelle. Entsprechend berechnete sich der systolische Ca²⁺-Fluoreszenz-Anstieg (F/F₀) als:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\text{Systolisches Maximum der Ca}^{2+}\text{-Fluoreszenz}}{\text{Diastolisches Minimum der Ca}^{2+}\text{-Fluoreszenz}}$$

Die Abfallkinetik der Ca²⁺-Transients bei elektrischer Stimulation wurde anhand des Parameters Rt80 beurteilt, der die Zeit vom systolischen Maximum bis zum 80-prozentigen Abfall der Ca²⁺-Fluoreszenz beschreibt (Ca²⁺-Rt80). Da in murinen Zellen die diastolische Ca²⁺-Elimination zu 90 % über die SERCA2a erfolgt [38, 39], ist die Ca²⁺-Rt80 vor allem auf die Aktivität dieses Transporters zurückzuführen. Aus dem Quotienten der Ca²⁺-Rt80 bei den Stimulationsfrequenzen von 3 Hz und 1 Hz wurde die FDAR-ratio zur Beurteilung der frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation (FDAR, vgl. 1.3.3) ermittelt:

$$\text{FDAR-ratio} = \frac{\text{Ca}^{2+}\text{-Rt80}_{3\text{Hz}}}{\text{Ca}^{2+}\text{-Rt80}_{1\text{Hz}}}$$

Zur Evaluation der Kontraktilität der Zellen wurde die relative Sarkomerlängenverkürzung (RSLV) anhand des systolischen Minimums und des unmittelbar vorausgehenden diastolischen Maximums der gemittelten Kontraktionskurve (KK) errechnet. Dieser Parameter wurde als prozentuale Veränderung erhoben:

$$\text{RSLV (\%)} = \frac{(\text{Diastolisches Maximum KK} - \text{Systolisches Minimum KK})}{\text{Diastolisches Maximum KK}} * 100$$

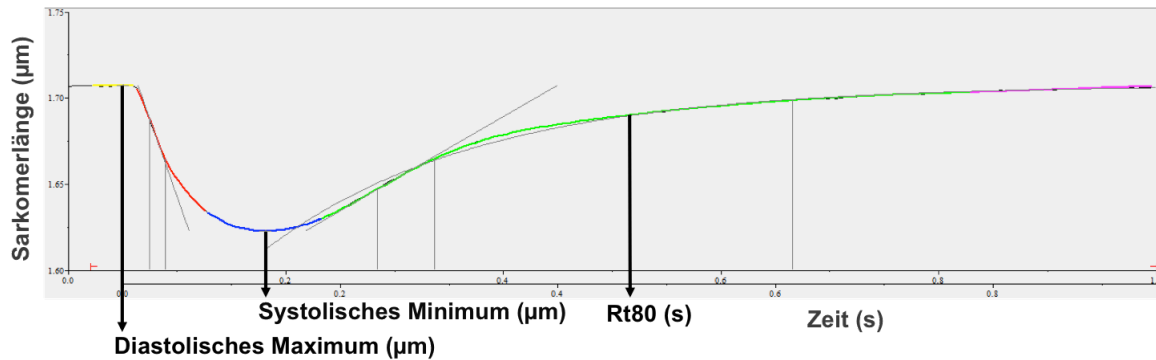


Abbildung 2-6: Kontraktionskurven-Analyse

Analyse einer gemittelten Kontraktionskurve bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz. Aufzeichnung der Auswertung im Programm IonWizard mit erläuternden Einträgen.

Die Zeit bis zum Erreichen von 80 Prozent der diastolischen Sarkomerlänge in der Relaxationsphase nach erfolgter Kontraktion wurde als Maß für die Geschwindigkeit der Kardiomyozytenrelaxation erfasst (SL-Rt80).

Die Pausierung der elektrischen Stimulation für zehn Sekunden diente der Untersuchung der Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR („Post-Pausen-Zunahme“ [77]). Ermittelt wurde hierzu die prozentuale Zunahme des F/F_0 des ersten Ca^{2+} -Transienten nach zehnssekündiger Stimulationspause im Vergleich zum gemittelten F/F_0 von der Pause vorangehenden Transienten bei basaler 1-Hz-Stimulation. Entsprechend wurde die relative Sarkomerlängenverkürzung der ersten Kontraktionskurve nach der Stimulationspause mit der gemittelten relativen Verkürzung vor der Pause verglichen:

$$\text{Post-Pausen-Zunahme } \text{F}/\text{F}_0 \text{ (\%)} = \left(\frac{\text{F}/\text{F}_0 \text{ nach Pause}}{\text{F}/\text{F}_0 \text{ vor Pause}} * 100 \right) - 100 \%$$

$$\text{Post-Pausen-Zunahme RSLV (\%)} = \left(\frac{\text{RSLV nach Pause}}{\text{RSLV vor Pause}} * 100 \right) - 100 \%$$

Kam es während der Stimulationspause zu Spontankontraktionen der Kardiomyozyten, so wurden diese Zellen für die Auswertung der Post-Pausen-Zunahme nicht berücksichtigt.

Die Applikation von Koffein in hoher Konzentration führt zur vollständigen Öffnung des RyR2 mit sofortiger vollständiger Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR [125]. Die Amplitude des Koffein-Transienten wurde daher als Maß für den SR Ca^{2+} -Gehalt ermittelt. Bei bekanntem SR Ca^{2+} -Gehalt ließ sich auch die anteilige systolische Ca^{2+} -Freisetzung bei Stimulationsfrequenz von 1 Hz („fractional release“) berechnen:

$$\text{Fractional Release}_{1\text{ Hz}} (\%) = \frac{F/F_{0\ 1\text{ Hz}}}{F/F_{0\ \text{Koffein}}} * 100$$

Von der SERCA2a in das SR befördertes Ca^{2+} kann unter Einfluss von Koffein aufgrund der weiterhin geöffneten RyR2 nicht wieder in das SR eingespeichert werden. Die Elimination von Ca^{2+} aus dem Zytosol erfolgt somit fast ausschließlich über den NCX [125]. Entsprechend ließ sich die Funktion des NCX anhand der Abfallkinetik des aufgezeichneten Koffein-Transienten bewerten. Hierfür wurde die von IonWizard berechnete Zeitkonstante τ verwendet, welche als monoexponentieller Fit des Abfalls des Koffein-Transienten ermittelt wurde. Bei bekannter NCX-Funktion einer Zelle ließ sich der Einfluss dieses Transporters auf die Ca^{2+} -Elimination während der elektrischen Stimulation herausrechnen, wodurch eine noch genauere Untersuchung der SERCA2a-Funktion über den Parameter τ_{SERCA2a} ermöglicht wurde [126]:

$$\tau_{\text{SERCA2a}} = \frac{1}{\left(\frac{1}{\tau_{1\text{ Hz}}} - \frac{1}{\tau_{\text{Koffein}}} \right)}$$

Diese Berechnung konnte somit jedoch nur für diejenigen Kardiomyozyten durchgeführt werden, für welche auch die Aufzeichnung eines Koffein-Transienten gelungen war.

2.3.3 Untersuchung des SR Ca^{2+} -Lecks mittels Tetracain

In ausreichend hohen Konzentrationen blockiert Tetracain die spontane diastolische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. In der Folge steigt der SR Ca^{2+} -Gehalt durch die SERCA2a-Aktivität, während die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration sinkt [127]. Die Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von Tetracain lässt sich daher als Maß für das diastolische SR Ca^{2+} -Leck verwenden. Dies gilt allerdings nur wenn der Gesamtgehalt an Ca^{2+} innerhalb der Zelle konstant bleibt. Daher wurde für diese Versuchsreihe der Na^{+} - Ca^{2+} -Austausch nach extrazellulär über den NCX unter Verwendung einer Na^{+} - und Ca^{2+} -freien

Lösung („0-Na⁺-0-Ca²⁺-Lösung“) unterbunden [85]. Ziel war es, den Einfluss von AS100105 auf das diastolische SR Ca²⁺-Leck zu untersuchen.

2.3.3.1 Vorbereitung der murinen Kardiomyozyten und Messbedingungen

Abweichend zu den Vorbereitungen für die Versuchsreihe zur elektromechanischen Kopplung (vgl. 2.3.2.1) wurden die Messkammern für die Tetracain-Experimente vor dem Auftragen der Isolationssuspension mit 2 µl Laminin beschichtet, um eine gute Haftung der Kardiomyozyten am Kammerboden auch bei häufigem Wechsel der Superfusionslösung zu gewährleisten.

Tabelle 2-4: 0-Na⁺-0-Ca²⁺-Lösung

Substanz	Molarität (mmol/l)	Molgewicht (g/mol)	Masse (g)
KCl	4	74,56	0,2982
LiCl	140	42,39	5,935
MgCl ₂	1	95,21	0,0952
HEPES	5	238,31	1,192
EGTA	10	380,35	3,804
Glucose	10	180,16	1,802
Gesamtvolumen 1000 ml mit ddH ₂ O; pH 7,4 bei RT mit LiOH; Lagerung bei 4 °C			

Tabelle 2-5: Tetracain-Lösung

Substanz	Molarität (mmol/l)	Molgewicht (g/mol)	Masse (g)
Tetracain	1	300,8	0,301
Gesamtvolumen 1000 ml mit 0-Na ⁺ -0-Ca ²⁺ -Lösung (Tabelle 2-4); pH 7,4 bei RT mit LiOH; Lagerung bei 4 °C			

Tabelle 2-6: Koffein-Lösung 0-Na⁺-0-Ca²⁺

Substanz	Molarität (mmol/l)	Molgewicht (g/mol)	Masse (g)
Koffein	100	194,2	19,42
Gesamtvolumen 1000 ml mit 0-Na ⁺ -0-Ca ²⁺ -Lösung (Tabelle 2-4); pH 7,4 bei RT mit LiOH; Lagerung bei 4 °C			

Pro Messkammer wurde nur eine Zelle gemessen. Die Farbstoffinkubationszeit wurde auf zwölf Minuten angepasst, um eine ausreichende Zahl an Kammern bzw. Zellen messen zu können. Um Schwankungen der Ca²⁺-Fluoreszenz durch nicht gebundene Farbstoffe bei den empfindlichen Messungen zu minimieren, wurde der Überstand in den Messkammern nach

Ablauf der Inkubationszeit dreimal in Folge entfernt und durch Basislösung für murine Zellen ersetzt (vgl. 2.2.4).

Zur Durchführung des Messprotokolls wurde die $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung (Tabelle 2-4) benötigt. Als weitere Superfusionslösungen wurden Tetracain-Lösung (Tabelle 2-5) und Koffein-Lösung (Tabelle 2-6) durch Zusatz der jeweiligen Substanz zur $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung angesetzt. Die Superfusionsgeschwindigkeit für die Basislösung betrug 80 ml/min. Der gemeinsame Zulauf für die $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung und die Tetracain-Lösung wurde erst unmittelbar vor Beginn der Messung möglichst nah an der ausgewählten Herzmuskelzelle platziert, um eine rasche Umspülung der Zelle mit der jeweiligen Lösung zu gewährleisten.

2.3.3.2 Messprotokoll

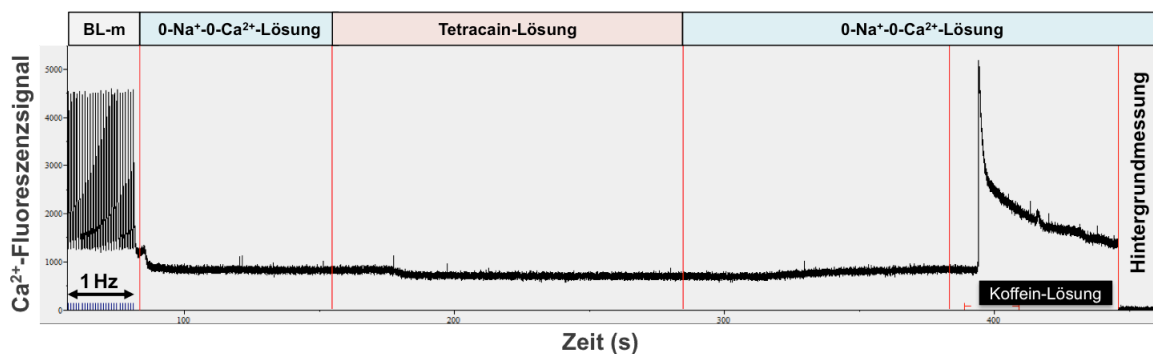


Abbildung 2-7: Messung des SR Ca^{2+} -Lecks in murinen Kardiomyozyten

Die Abbildung veranschaulicht das Messprotokoll zur Untersuchung des SR Ca^{2+} -Lecks in murinen Kardiomyozyten. Zu Beginn wurden die Herzmuskelzellen in Basislösung für murine Zellen (BL-m) mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert. Es folgte die Messung des Ruhefluoreszenzniveaus unter $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung und Tetracain-Lösung. Nach dem Auswaschen des Tetracains mit $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung erfolgte die Applikation von Koffein-Lösung. Zuletzt wurde die unspezifische Ca^{2+} -Hintergrundfluoreszenz aufgezeichnet. Originalregistrierung aus dem Programm IonWizard mit erläuternden Einträgen.

Zunächst wurden die Zellen mit der Basislösung für murine Kardiomyozyten superfundiert und mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert. Nur bei intakten rhythmisch schlagenden Zellen, die einen Steady State der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden und Kontraktionskurven erreichten (vgl. 2.3.2.2), wurde das Messprotokoll fortgeführt. Nach Aufzeichnung von 10 - 20 Kontraktionen im Steady State wurde die elektrische Stimulation beendet. Zeitgleich wurde die Zufuhr der Basislösung gestoppt und die Superfusion mit $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung in unmittelbarer Nähe zur Zelle begonnen. Nach einer Einwaschzeit von etwa zwei Minuten, die zum Erreichen einer stabilen Ca^{2+} -Fluoreszenz nötig war, wurde unter Verwendung des selben Zulaufs nun auf Tetracain-Lösung umgeschaltet. Das Absinken der Ca^{2+} -Fluoreszenz hierunter wurde aufgezeichnet, wobei erneut ein stabiles Fluoreszenzniveau abgewartet wurde. Es schloss sich ein zwei- bis dreiminütiger Auswaschvorgang für das Tetracain mit $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung an. Die Messung wurde anschließend kurz pausiert,

um den Zulauf für die Koffein-Lösung (Koffein in $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$) neben der untersuchten Zelle zu positionieren. Nach Wiederaufnahme der Messung erfolgte die Applikation des Koffeins. Nach Abschluss des Messprotokolls wurde die Ca^{2+} -Hintergrundfluoreszenz in einem zellfreien Areal in der Nähe der untersuchten Zelle aufgezeichnet. Das Messprotokoll ist in Abbildung 2-7 dargestellt.

2.3.3.3 Auswertung

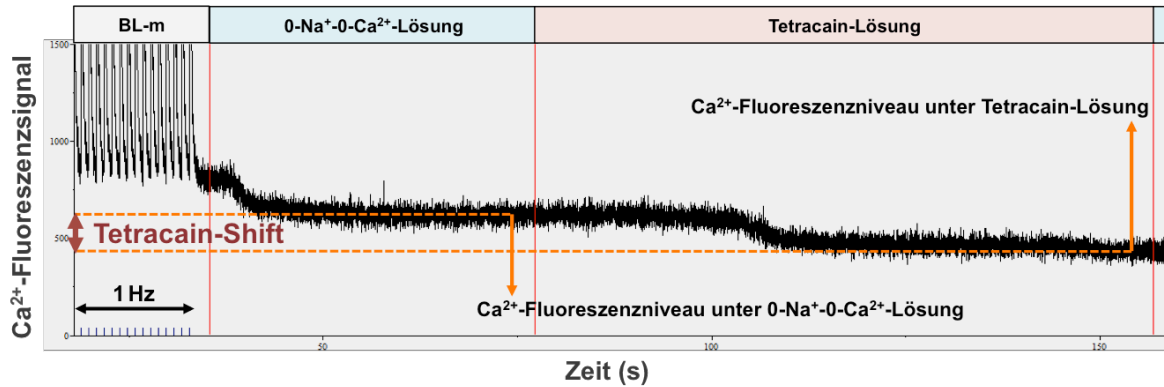


Abbildung 2-8: Messung des Tetracain-Shifts

Zur Analyse des Ca^{2+} -Fluoreszenzabfalls unter Superfusion mit Tetracain-Lösung (Tetracain-Shift) wurden die stabilen Ca^{2+} -Fluoreszenzniveaus unter $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ - und Tetracain-Lösung ermittelt. Die Skalierung des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals wurde zur besseren Darstellung des Tetracain-Shifts verändert (Spitzen der Ca^{2+} -Transienten bei 1 Hz abgeschnitten). Originalregistrierung aus dem Programm IonWizard mit erläuternden Einträgen.

Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz vom Ca^{2+} -Fluoreszenzsignal wurde der Ca^{2+} -Fluoreszenzabfall unter Superfusion mit Tetracain-Lösung im Vergleich zur $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung („Tetracain-Shift“) ausgewertet (Abbildung 2-8). Dazu wurden die Werte für die stabilen Ca^{2+} -Fluoreszenzniveaus unter $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung sowie unter Tetracain-Lösung ermittelt und hieraus der Quotient gebildet:

$$F/F_{0 \text{ Tetracain}} = \frac{\text{Ca}^{2+}\text{-Fluoreszenzniveau unter Tetracain-Lösung}}{\text{Ca}^{2+}\text{-Fluoreszenzniveau unter } 0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}\text{-Lösung}}$$

Dabei ist $F/F_{0 \text{ Tetracain}}$ natürlich kleiner als 1, da hier ein Abfall unter die Grundlinie gemessen wurde – je niedriger der Wert, desto größer das gemessene SR Ca^{2+} -Leck. Für die Quantifizierung des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks wurde folgende Formel [128] zur Ermittlung absoluter Ca^{2+} -Werte verwendet, um die Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration („Tetracain- Ca^{2+} -Shift“) der Zelle zu berechnen:

$$\text{Ca}^{2+} \text{ (nmol/l)} = \frac{K_d * F/F_{0 \text{ Tetracain}}}{\left(\left(\frac{K_d}{\text{diastCa}^{2+}} \right) + \left(1 - F/F_{0 \text{ Tetracain}} \right) \right)}$$

Die Dissoziationskonstante (K_d) für Fluo-4 betrug dabei 1100 nmol/l [128] und für das Ruheniveau des diastolischen Ca^{2+} (diastCa^{2+}) wurde ein Wert von 96 nmol/l angenommen [5]. Analog konnte mit dieser Gleichung der Ca^{2+} -Wert für die Amplitude des koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten (d.h. der SR Ca^{2+} -Gehalt, vgl. 2.3.2.3) berechnet werden. Für diejenigen Kardiomyozyten, bei denen ein Koffein-Transient aufgezeichnet werden konnte, wurde so das gemessene Tetracain-sensitive SR Ca^{2+} -Leck („Tetracain- Ca^{2+} -Shift“) in Bezug zum SR Ca^{2+} -Gehalt der Zelle gesetzt („leak-load-relationship“):

$$\text{SR } \text{Ca}^{2+}\text{-Leck pro SR } \text{Ca}^{2+}\text{-Beladung (\%)} = \frac{\text{Tetracain-}\text{Ca}^{2+}\text{-Shift}}{\text{SR } \text{Ca}^{2+}\text{-Gehalt}} * 100$$

2.4 Konfokalmikroskopische Messung humaner Kardiomyozyten

Die Versuche an humanen Kardiomyozyten zur Untersuchung des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks (vgl. 2.3.3) und von zellulären Arrhythmie-Korrelaten (vgl. 2.4.2) wurden an einem Konfokalmikroskop LSM 5 Pascal (Zeiss/Oberkochen/Deutschland) durchgeführt.

2.4.1 Funktionsprinzip der Messung

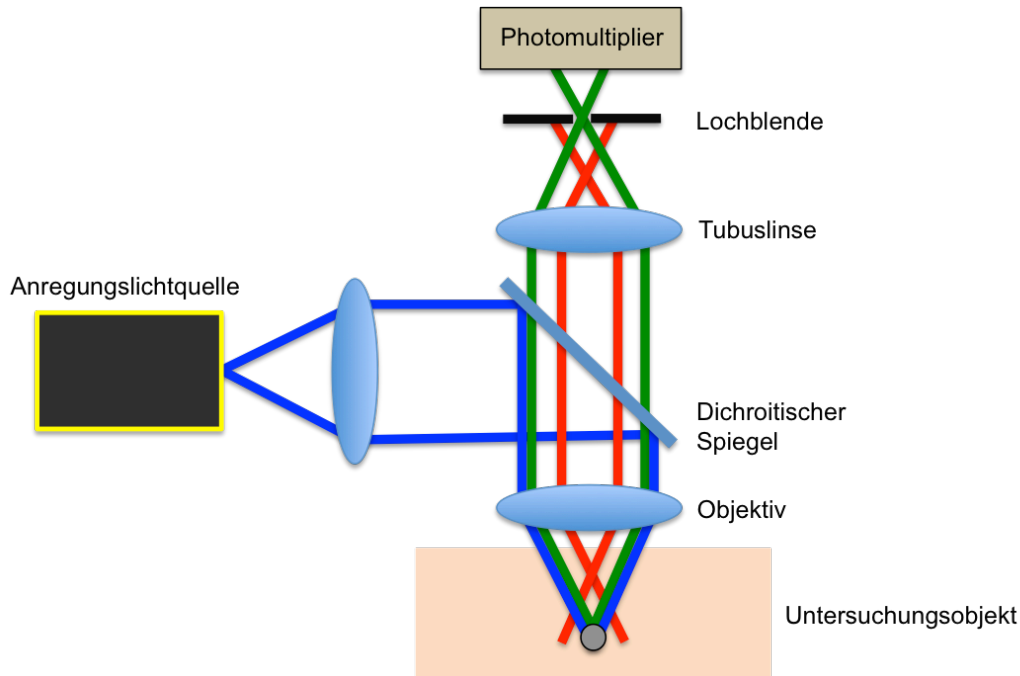


Abbildung 2-9: Strahlengang bei der Messung am Konfokalmikroskop

Das Anregungslicht (blau) wird mithilfe eines dichroitischen Spiegels umgelenkt und vom Objektiv auf einen Punkt innerhalb des Untersuchungsobjekts fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht (grün) weist eine abweichende Wellenlänge auf und passiert den dichroitischen Spiegel. Es gelangt über das Objektiv und eine Tubuslinse zum Photomultiplier. Eine Lochblende verhindert die Aufnahme von Fluoreszenz- oder Streulicht aus anderen Brennebenen des Objekts (rot).

Ein konfokales Mikroskop ermöglicht die punktgenaue Fokussierung und Abbildung eines Untersuchungsobjekts. Durch den Einsatz einer Lochblende wird der Beobachtungsstrahlengang auf Licht aus der im Fokus liegenden Brennebene reduziert. Im Unterschied zu konventionellen Mikroskopen kommt es daher nicht zur Überlagerung der Bildinformation durch Licht aus darüber oder darunter liegenden Ebenen, wodurch eine kontrastreichere Darstellung ermöglicht wird. Die Untersuchung der humanen Kardiomyozyten erfolgte unter Verwendung des Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-3. Abbildung 2-9 veranschaulicht den Strahlengang bei den Messungen. Das Konfokalmikroskop LSM 5 Pascal erlaubte über ein System von beweglichen Spiegeln eine punktuelle Rasterung der Zellen durch Abtastung mit einem anregenden Laserstrahl (Argon-Laser, Wellenlänge 488 nm). Durch wiederholte Rasterung wurden ausgewählte Zellabschnitte im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Das Fluoreszenzlicht wurde von einem Photomultiplier detektiert und in Form von elektrischer Information an einen Computer weitergeleitet. Die Ansteuerung der Anlage und Registrierung der Daten erfolgte mit der Software LSM Pascal (Carl Zeiss MicroImaging GmbH/Jena/Deutschland).

2.4.2 Untersuchung spontaner SR Ca^{2+} -Freisetzungsereignisse

In humanen atrialen Kardiomyozyten wurde zur Untersuchung des SR Ca^{2+} -Lecks die Methode der Messung von unsynchronisierte diastolische Ca^{2+} -Freisetzungsereignisse aus RyR2-Clustern (Ca^{2+} -Sparks, vgl. 1.4.2) angewendet, da isolierte humane Kardiomyozyten nicht ausreichend gut in den Versuchskammern anhefteten, um die schnellen Lösungswechsel bei Tetracain-Messungen zu tolerieren. Dies ermöglichte zugleich die Validierung der Wirkungen von AS100105 auf das SR Ca^{2+} -Leck mit einer weiteren Methode. Darüber hinaus wurde der Einfluss von AS100105 auf das Auftreten von arrhythmogenen spontanen zellulären Ca^{2+} -Freisetzungen („SCaFs“) untersucht. Im Unterschied zu den streng lokal begrenzten Ca^{2+} -Sparks breiteten sich SCaFs auf den gesamten untersuchten Zellbereich aus. Derart umfangreiche spontane diastolische Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR werden als zelluläre Arrhythmie-Korrelate gewertet [8, 123, 129], so dass ihre Quantifizierung die Untersuchung eines möglichen Einflusses von AS100105 auf die Anfälligkeit der Herzmuskelzellen für Arrhythmien ermöglichte.

2.4.2.1 Vorbereitung der humanen Kardiomyozyten und Messbedingungen

Vier bis sechs Messkammern wurden befüllt mit jeweils 400 μl Zellsuspension aus der Kardiomyozytenisolation. Aufgrund des schlechteren Anheftens der humanen Vorhofzellen

wurden die Messkammern mit 3 μl Laminin beschichtet und es wurde eine Sedimentations- und Fixationszeit von 45 Minuten eingehalten. Jede Kammer wurde vor der Messung für 30 Minuten mit Fluo-3-AM-haltiger Farbstofflösung inkubiert. Der Ca^{2+} -Gehalt der Farbstofflösung betrug für humane Kardiomyozyten 1 mmol/l. Der letzte Schritt des Ca^{2+} -Aufbaus (vgl. 2.1.2) zum Erreichen der Zielkonzentration von 2 mmol/l wurde erst durch die Superfusion mit der Basislösung für humane Zellen (vgl. 2.2.4, Tabelle 2-2) unmittelbar vor der Messung abgeschlossen. Um eine langsame Gewöhnung der Herzmuskelzellen an die steigende Ca^{2+} -Konzentration zu gewährleisten und ein Wegspülen der Zellen durch den Flüssigkeitsstrom in der Messkammer zu verhindern, wurde die Superfusionsgeschwindigkeit auf 40 ml/min eingestellt. Vor Beginn der Messungen wurde eine Wartezeit von fünf Minuten eingehalten, um die Ca^{2+} -Zielkonzentration in der Messkammer zu erreichen und ungebundene Farbstoffreste auszuwaschen.

2.4.2.2 Messprotokoll

Zunächst wurde das System als konventionelles Lichtmikroskop verwendet, um eine geeignete Zelle auszuwählen. Anschließend wurde in den Konfokalmodus umgeschaltet. Unter Verwendung des Computerprogramms LSM Pascal wurde eine Übersichtsaufnahme einer ausgewählten Kardiomyozyte in Form einer zweidimensionalen Rasterung angefertigt. Bei laufender Wiederholung dieses Prozesses wurde durch vertikale Bewegung des Objektisches per Feintrieb die ideale Brennebene zur Untersuchung der Kardiomyozyte ausgewählt. Für ein optimales Bildsignal konnten Laserintensität und die Verstärkung des Photomultipliers angepasst werden.

Im Computerprogramm wurde eine Linie mit einer definierten Länge von 38,4 μm gezogen. Diese Linie wurde so in der Zelle platziert, dass ein kleiner Anteil für die Messung der Ca^{2+} -Hintergrundfluoreszenz außerhalb der Zelle lag. Bis unmittelbar vor der Messung wurden die Zellen in der Messkammer mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert. Vor Beginn der Aufzeichnung wurde ein Intervall von drei Sekunden abgewartet, in denen nicht stimuliert wurde, um eine verstärkte Ca^{2+} -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums zu ermöglichen. Die justierte Linie wurde anschließend vom Konfokalmikroskop 10.000 Mal in Folge ohne Verzögerung mit einer Auflösung von 512 Pixeln gerastert. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Pixelgröße von 0,075 μm x 0,075 μm und die Intensitätsauflösung jedes Pixels lag bei 12 bit (entsprechend 4096 Intensitätsstufen). Zeitlich aufeinanderfolgende Rasterungen der justierten Linie wurden dabei durch das Computerprogramm parallel

aneinandergereiht und als Bild ausgegeben („line-scan“). Lokale zeitlich begrenzte Ca^{2+} -Fluoreszenzerhöhungen entlang der erfassten Linie in der untersuchten Kardiomyozyte wurden so in Form von Ca^{2+} -Sparks erkennbar (Abbildung 2-10). SCaFs waren innerhalb der Zelle über die gesamte gerasterte Linie sichtbar (vgl. 3.2.3, Abbildung 3-19). Pro Messkammer konnten je nach Zellzahl und -qualität bis zu 20 Zellen gemessen werden.

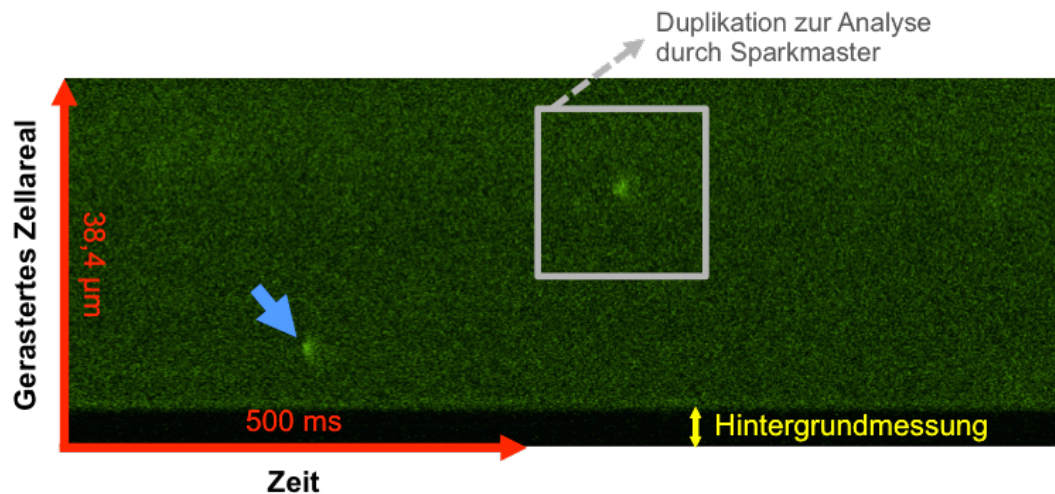


Abbildung 2-10: Konfokalmikroskopischer Line-Scan

Das Konfokalmikroskop zeichnete die Ca^{2+} -Fluoreszenz entlang einer 38,4 µm langen Linie auf, die zuvor im Bereich der untersuchten humanen Kardiomyozyte markiert wurde. Ein kleiner Teil dieser Linie befand sich dabei außerhalb der Zelle und diente zur Messung der Ca^{2+} -Hintergrundfluoreszenz. Durch verzögerungsfreie Wiederholung der Linien-Rasterung wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Zur qualitativen Untersuchung wurde im Programm ImageJ ein Bildausschnitt um einen Ca^{2+} -Spark dupliziert (graues Fenster) und mithilfe des Plug-ins Sparkmaster analysiert (vgl. 2.4.2.3). Der blaue Pfeil markiert einen weiteren Ca^{2+} -Spark. Originalregistrierung eines Line-Scans mit erläuternden Einträgen. Helligkeit zur verbesserten Reproduktion um 20 % erhöht.

2.4.2.3 Auswertung

Die Auswertung der aufgezeichneten Fluoreszenzsignale erfolgte in einem späteren Arbeitsschritt unter Verwendung des Computerprogramms ImageJ (National Institutes of Health/Bethesda/USA). Die konfokalmikroskopischen Line-Scans aus den Messungen wurden dazu erneut aufgerufen. Zunächst wurde die Hintergrundfluoreszenz aus dem schmalen Aufzeichnungsbereich erfasst, der außerhalb der Zelle lag. Bildausschnitte die einen oder mehrere Ca^{2+} -Sparks enthielten wurden dupliziert und konnten unter Berücksichtigung der Hintergrundfluoreszenz mit dem ImageJ-Plug-in Spark-Master [130] analysiert werden. Spark-Master erkennt einzelne Sparks als signifikante Abweichungen über dem Signalausrauschen und errechnete Amplitude (F/F_0), Breite (FW: „full width“) und Dauer (FD: „full duration“) der Ca^{2+} -Sparks. Nach Übertragung in eine Excel-Tabelle konnte aus diesen Werten die Ca^{2+} -Spark-Größe (FS: „full size“) errechnet werden:

$$\text{Ca}^{2+}\text{-Spark-Größe } (\mu\text{m} \cdot \text{ms}) = \frac{F}{F_0} * \text{FW} * \text{FD}$$

Durch die Summierung der Ca^{2+} -Spark-Größe aller Ca^{2+} -Sparks einer Messung wurde das Gesamt- Ca^{2+} -Leck einer Zelle (FL: „full leak“) berechnet. Für das gerasterte Zellareal wurde nach Abzug des jeweiligen Hintergrundareals eine mittlere Länge von 32,5 μm aus den Mittelwerten der Messungen bestimmt, während die Dauer der Rasterung 7,68 s für die 10.000 Scan-Linien betrug. Mit diesen Werten konnte das zelluläre Gesamt- Ca^{2+} -Leck auch als Zunahme der Ca^{2+} -Fluoreszenz mF/F_0 angegeben werden:

$$\text{mF}/\text{F}_0 = \frac{\text{FL } (\mu\text{m} \cdot \text{ms})}{\text{Gerastertes Zellareal } (\mu\text{m}) * \text{Dauer der Rasterung (s)}}$$

Unter Berücksichtigung der Anzahl von Ca^{2+} -Sparks pro Zelle wurde die Ca^{2+} -Spark-Frequenz ermittelt:

$$\text{Ca}^{2+}\text{-Spark-Frequenz } (1/(100 \mu\text{m} \cdot \text{s})) = \frac{\text{Anzahl Ca}^{2+}\text{-Sparks pro Zelle} * 100}{\text{Gerastertes Zellareal } (\mu\text{m}) * \text{Dauer der Rasterung (s)}}$$

Nicht in allen gemessenen Zellen wurden Ca^{2+} -Sparks aufgezeichnet. Für beide Messgruppen wurde der Anteil „sparkender“ Zellen erhoben.

Das Auftreten von SCaFs wurde quantitativ ausgewertet. Als SCaFs wurden alle spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen gewertet, die bei der konfokalmikroskopischen Aufzeichnung über die gesamte Breite des gemessenen Zellabschnitts sichtbar waren. Kardiomyozyten in denen SCaFs auftraten wurden als arrhythmogene Zellen bewertet. Unter Berücksichtigung der Dauer der Rasterung einer Zelle von 7,68 s wurde die Frequenz der SCaFs berechnet:

$$\text{SCaF-Frequenz} = \frac{\text{Anzahl SCaFs pro Zelle}}{\text{Dauer der Rasterung (s)}}$$

Kardiomyozyten in denen SCaFs auftraten, wurden nicht für die Auswertung der Ca^{2+} -Sparks berücksichtigt.

2.5 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Zum Vergleich von Inhibitorgruppe und Kontrollgruppe wurden alle gesammelten Daten einer Versuchsreihe mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Microsoft/Redmond/USA) nach Gruppenzugehörigkeit gesammelt und ausgewertet. Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler (SEM) wurden berechnet. Im Ergebnisteil der Arbeit

werden alle angegebenen Daten als Mittelwert \pm SEM präsentiert. Sofern nicht anders angegeben, wurde zur Signifikanzprüfung der t-Test mit dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ verwendet. Für dichotome Datensätze wurde der Fisher-Test verwendet.

In den Balken- und Punktdiagrammen des Ergebnisteils wurden die errechneten Mittelwerte graphisch dargestellt mit Angabe der SEM in Form von Fehlerbalken. Signifikante Unterschiede wurden mit „ $p < 0,05$ “ markiert, während andernfalls das Kürzel „n. s.“ (nicht signifikant) verwendet wurde. Alle Diagramme sowie die Originalregistrierungen aus den Versuchen am Epifluoreszenzmikroskop wurden mit dem Programm Prism 6.0 (GraphPad Software/La Jolla/USA) erstellt. Die Originalregistrierungen für die konfokalmikroskopischen Versuche wurden anhand der Bilddateien erstellt, die das Programm LSM Pascal (Zeiss/Oberkochen/Deutschland) während der Messung lieferte.

2.6 Bezugsquellen der Chemikalien

Tabelle 2-7: Herstellerangaben verwendeter Chemikalien

AS100105	Allosteros Therapeutics Inc./Sunnyvale/USA
CaCl ₂	Sigma-Aldrich/München/Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich/München/Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich/München/Deutschland
Fluo-3-AM	Molecular Probes/Eugene/USA
Fluo-4-AM	Molecular Probes/Eugene/USA
Glucose	Carl Roth GmbH/Karlsruhe/Deutschland
HCl	Carl Roth GmbH/Karlsruhe/Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH/Karlsruhe/Deutschland
Isoprenalin	Sigma-Aldrich/München/Deutschland
KCl	Merck/Darmstadt/Deutschland
Koffein	Sigma-Aldrich/München/Deutschland
Laminin	Sigma-Aldrich/München/Deutschland
LiCl	Sigma-Aldrich/München/Deutschland
LiOH	Sigma-Aldrich/München/Deutschland
MgCl ₂	Carl Roth GmbH/Karlsruhe/Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH/Karlsruhe/Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Merck/Darmstadt/Deutschland
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich/München/Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH/Karlsruhe/Deutschland
Pluronic F-127	Molecular Probes/Eugene/USA
Tetracain	Sigma-Aldrich/München/Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von AS100105 in CaMKII δ_C -überexprimierenden murinen Kardiomyozyten

3.1.1 Biometrische Daten der CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäuse

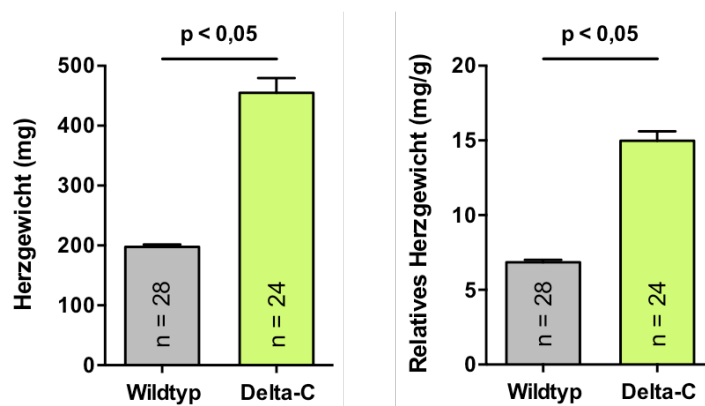


Abbildung 3-1: Biometrische Daten transgener Mäuse

Herzgewicht und relatives Herzgewicht der untersuchten CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäuse (Delta-C) waren signifikant erhöht im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren. n = Mäuse

Die isolierten Herzmuskelzellen für die Versuchsreihen am Epifluoreszenzmikroskop stammten von 24 transgenen CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäusen. Bei einem durchschnittlichen Herzgewicht dieser Tiere von $454,83 \pm 24,83$ mg und einem mittleren Körpergewicht von $29,90 \pm 1,14$ g ergab sich ein relatives Herzgewicht-zu-Körpergewicht-Verhältnis von $14,98 \pm 0,63$ mg/g. Zum Vergleich wurden biometrische Daten von Wildtyp-Geschwistertieren aus dem Bestand dieser Züchtung erhoben. Bei 28 Wildtyp-Mäusen lag das mittlere Herzgewicht bei $197,61 \pm 3,87$ mg und das durchschnittliche Körpergewicht bei $29,17 \pm 0,73$ g. Das relative Herzgewicht betrug $6,85 \pm 0,16$ mg/g. Bei signifikant erhöhtem Herzgewicht und nahezu unverändertem Körpergewicht war das relative Herzgewicht der CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäuse gegenüber den Wildtyp-Geschwistertieren signifikant um 118,69 % erhöht (Abbildung 3-1). Das mittlere Alter der transgenen Mäuse betrug zum Untersuchungszeitpunkt $20,50 \pm 1,45$ Wochen, während die Wildtyp-Geschwistertiere mit $15,39 \pm 0,81$ Wochen signifikant jünger waren. Um einen Alterseffekt auszuschließen wurde eine verkleinerte Vergleichsgruppe aus 18 transgenen und 19 Wildtyp-Mäusen erstellt, welche ein Alter von $17,72 \pm 1,40$ Wochen (δ_C -transgen) bzw. $17,79 \pm 0,65$ Wochen (Wildtyp) aufwiesen. Auch in dieser Gruppe zeigte sich das relative Herzgewicht der CaMKII δ_C -

überexprimierenden Mäuse mit $14,57 \pm 0,68$ mg/g signifikant deutlich erhöht gegenüber $6,69 \pm 0,18$ mg/g bei den Wildtyp-Geschwistertieren.

3.1.2 Auswirkungen von AS100105 auf die elektromechanische Kopplung

Zur Untersuchung der Effekte des CaMKII-Inhibitors AS100105 auf die elektromechanische Kopplung (vgl. 1.2) wurden Versuche an murinen Kardiomyozyten durchgeführt, die aus dem Ventrikelgewebe von transgen die CaMKII δ_C überexprimierenden Mäusen isoliert wurden. An einem Epifluoreszenzmikroskop wurden die Herzmuskelzellen unter Einwirkung von AS100105 oder unter Kontrollbedingungen gemessen (vgl. 2.3.2). Unter Verwendung des Ca²⁺-Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-4 wurde der Ca²⁺-Haushalt der Zellen untersucht, während eine integrierte Kamera die Kontraktionen der jeweiligen Zellen registrierte. Ein geeignetes Messprotokoll (vgl. 2.3.2.2) ermöglichte die Auswertung wichtiger Parameter der elektromechanischen Kopplung, die im Folgenden dargestellt werden.

3.1.2.1 Systolische Ca²⁺-Freisetzung und Kardiomyozytenkontraktion

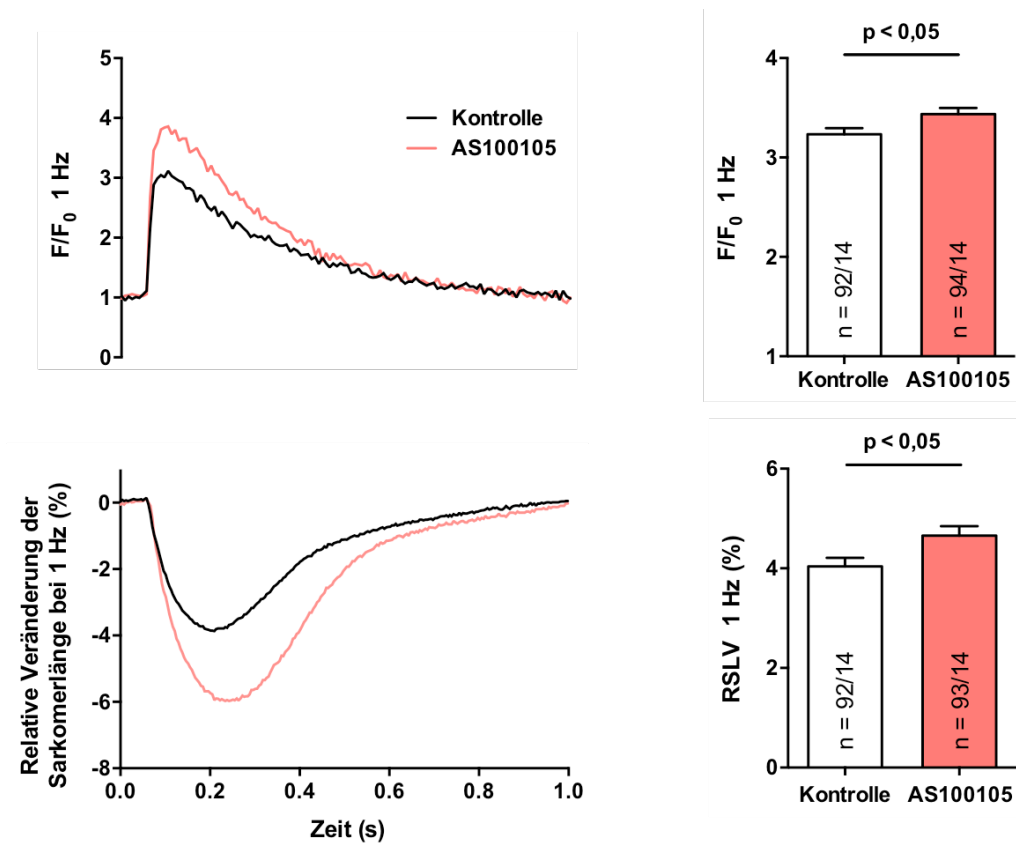


Abbildung 3-2: Ca²⁺-Transient und Sarkomerlängenverkürzung bei 1 Hz

Illustrative Originalregistrierungen eines gemittelten Ca²⁺-Transients und der zugehörigen Sarkomerlängenveränderung bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz (links) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Einfluss von AS100105 (rot). Die Balkendiagramme der Mittelwerte zeigen die signifikante Erhöhung der Ca²⁺-Fluoreszenz-Amplitude F/F₀ (oben rechts) und die signifikante Verstärkung der relativen Sarkomerlängenverkürzung (RSLV, unten rechts) in der Inhibitorgruppe. n = Kardiomyozyten/Mäuse

Während der Systole kommt es zu einem starken Anstieg des zytosolischen freien Ca^{2+} , wodurch die Kontraktion der Myofilamente ausgelöst wird (vgl. 1.2.1). Der Einfluss von AS100105 hierauf wurde bei Stimulationsfrequenzen von 1 Hz, 2 Hz und 3 Hz untersucht. Abbildung 3-2 veranschaulicht die Messergebnisse bei der Stimulationsfrequenz von 1 Hz. AS100105 führte bei 1-Hz-Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das F/F_0 war in der Inhibitorgruppe mit $3,44 \pm 0,06$ ($n = 94/14$) signifikant erhöht gegenüber $3,23 \pm 0,06$ ($n = 92/14$) unter Kontrollbedingungen. Auch hinsichtlich der Kontraktilität der Kardiomyozyten zeigte sich entsprechend eine signifikante Verstärkung unter AS100105. Die relative Sarkomerlängenverkürzung bei 1 Hz betrug unter CaMKII-Inhibition $4,66 \pm 0,19$ % ($n = 93/14$) im Vergleich zu $4,04 \pm 0,17$ % ($n = 92/14$) in der Kontrollgruppe.

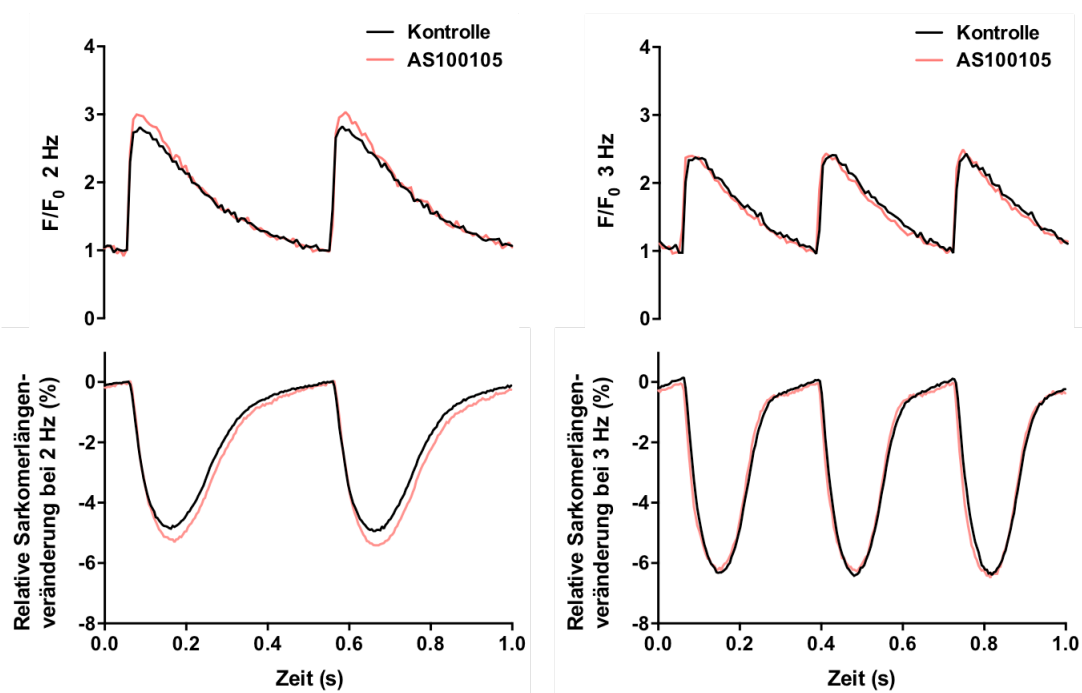


Abbildung 3-3: Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängenverkürzung bei 2 Hz und 3 Hz

Illustrative Originalregistrierungen der Ca^{2+} -Fluoreszenz-Amplitude F/F_0 (oben) und der jeweils zugehörigen Kontraktionskurven (unten) bei Stimulationsfrequenzen von 2 Hz (links) und 3 Hz (rechts). Es zeigten sich über beide Frequenzen keine signifikanten Unterschiede durch CaMKII-Inhibition mittels AS100105 (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarz).

Bei Steigerung der Stimulationsfrequenz auf 2 Hz und 3 Hz waren zwischen Kontroll- (K) und Inhibitorgruppe (AS) keine signifikanten Unterschiede der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und der kardiomyozytären Kontraktilität mehr feststellbar (2 Hz F/F_0 K: $2,83 \pm 0,07$ vs. AS: $2,89 \pm 0,06$ ($n = 58/11$ vs. $n = 60/11$); 2 Hz RSLV K: $5,08 \pm 0,30$ % vs. AS: $5,15 \pm 0,27$ % ($n = 58/11$ vs. $n = 60/11$); 3 Hz F/F_0 K: $2,42 \pm 0,05$ vs. AS: $2,42 \pm 0,05$ ($n = 58/11$ vs. $n = 60/11$); 3 Hz RSLV K: $5,90 \pm 0,42$ % vs. AS: $5,76 \pm 0,35$ % ($n = 58/11$ vs. $n = 60/11$)).

Insgesamt kam es damit unter AS100105 zu einer Zunahme der Amplitude der systolischen Ca^{2+} -Transienten und der Kontraktilität im Bereich der basalen Stimulationsfrequenz von 1 Hz, nicht jedoch bei höheren Stimulationsfrequenzen (Abbildung 3-3).

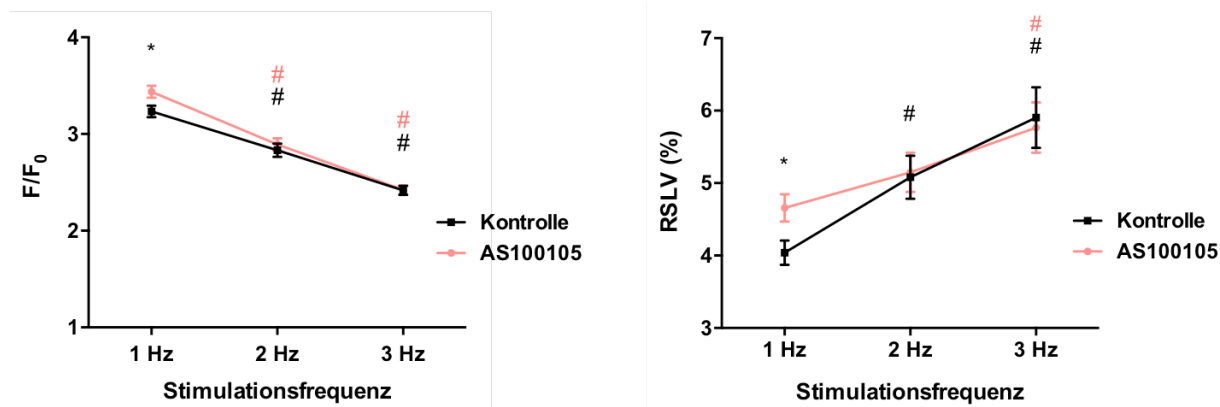


Abbildung 3-4: Kraft-Frequenz-Beziehung

Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden (links) und der relativen Sarkomerlängenverkürzung (RSLV, rechts) über die untersuchten Stimulationsfrequenzen 1 Hz, 2 Hz und 3 Hz. Mit Zunahme der Frequenz kam es in beiden Gruppen zur signifikanten Abnahme des F/F_0 bei signifikant zunehmender Kontraktilität. (*: unter AS100105 signifikant unterschiedlich versus Kontrolle bei dieser Frequenz; #: signifikant unterschiedlich versus 1-Hz-Stimulation innerhalb der jeweiligen Messgruppe)

Innerhalb der jeweiligen Messgruppe kam es bei Steigerung der Stimulationsfrequenz zu signifikanten Veränderungen der Messwerte im Vergleich zur 1-Hz-Stimulation. In Kontroll- und Inhibitorgruppe führte die Steigerung der Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf 3 Hz jeweils zu einer signifikanten Abnahme der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude, wohingegen die Kontraktilität der Kardiomyozyten signifikant zunahm (Abbildung 3-4). Diese frequenz-abhängigen Veränderungen der Messwerte wurden durch den CaMKII-Inhibitor AS100105 nicht beeinflusst (2-Wege-RM-ANOVA).

3.1.2.2 Diastolische Ca^{2+} -Elimination und Kardiomyozytenrelaxation

In Mäusen erfolgt die diastolische Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol zu 90 % durch Rückaufnahme des Ca^{2+} in das SR und zu lediglich 9 % durch Extrusion aus der Zelle via NCX, so dass die Geschwindigkeit des Abfalls des systolischen Ca^{2+} -Transienten überwiegend von der Aktivität der SERCA2a abhängig ist (vgl. 1.2.2). Die Geschwindigkeit der diastolischen Ca^{2+} -Elimination wurde anhand der Ca^{2+} -Rt80 ermittelt (vgl. 2.3.2.3). AS100105 hatte keinen Einfluss auf die diastolische Ca^{2+} -Elimination. Es zeigte sich über alle Frequenzen kein signifikanter Unterschied der Ca^{2+} -Rt80 unter AS100105 im Vergleich zu den Messungen unter Kontrollbedingungen (1 Hz Ca^{2+} -Rt80 K: $0,427 \pm 0,006$ s vs. AS: $0,417 \pm 0,006$ s (n = 92/14 vs. n = 94/14); 2 Hz Ca^{2+} -Rt80 K: $0,269 \pm 0,003$ s vs. AS:

$0,271 \pm 0,003$ s (n = 58/11 vs. n = 60/11); 3 Hz Ca^{2+} -Rt80 K: $0,198 \pm 0,001$ s vs. AS: $0,199 \pm 0,001$ s (n = 58/11 vs. n = 60/11)).

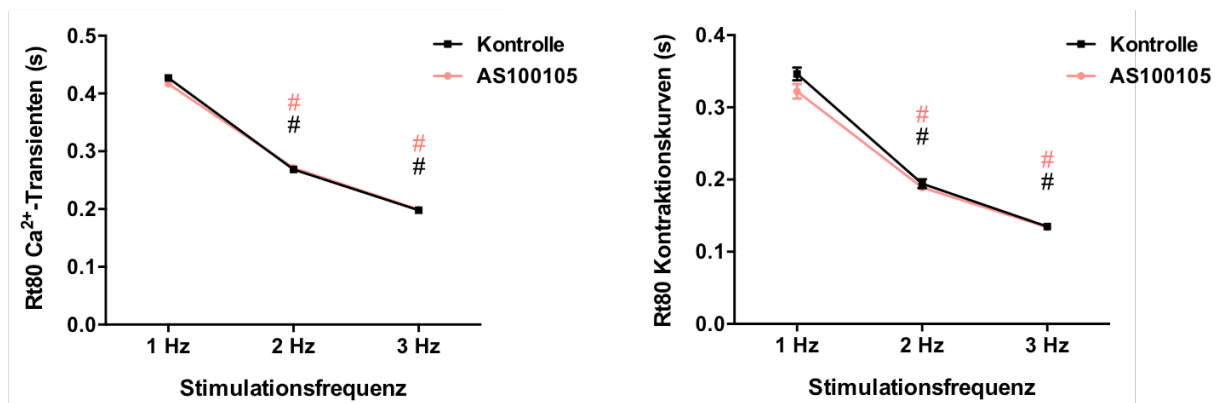


Abbildung 3-5: Relaxationskinetik der Ca^{2+} -Transienten und Kontraktionskurven

Mit steigender Stimulationsfrequenz beschleunigten sich die Ca^{2+} -Elimination und die Kardiomyozytenrelaxation in beiden Messgruppen. AS100105 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Rt80 der Ca^{2+} -Transienten (links) oder der Kontraktionskurven (rechts) bei den Stimulationsfrequenzen von 1 Hz, 2 Hz und 3 Hz. (#: signifikant unterschiedlich versus 1-Hz-Stimulation innerhalb der jeweiligen Messgruppe)

Im Sinne der frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation (FDAR, vgl. 1.3.3) war die Ca^{2+} -Rt80 in beiden Gruppen bei den höheren Stimulationsfrequenzen von 2 Hz und 3 Hz gegenüber der 1-Hz-Stimulation signifikant verkürzt (Abbildung 3-5). Anhand der FDAR-ratio (vgl. 2.3.2.3) konnte gezeigt werden, dass der neuartige CaMKII-Inhibitor AS100105 die FDAR dabei nicht beeinflusste (Abbildung 3-6). Die FDAR-ratio betrug in der Inhibitorgruppe $0,493 \pm 0,006$ (n = 58/11) im Vergleich zu einem nicht signifikant (n. s.) unterschiedlichen Wert von $0,479 \pm 0,007$ (n = 60/11) in der Kontrollgruppe.

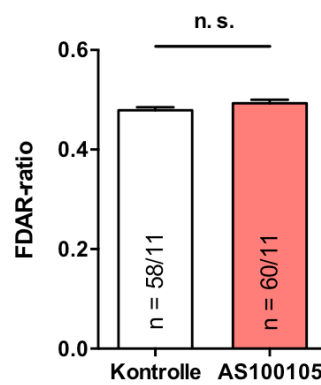


Abbildung 3-6: FDAR-ratio

Die FDAR-ratio zeigte sich unter AS100105 unverändert. Der CaMKII-Inhibitor hatte demnach keinen Einfluss auf die frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation. n = Kardiomyozyten/Mäuse

Mittels der Rt80 der Kontraktionskurven (SL-Rt80) wurde zudem die mechanische Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten während der Diastole untersucht (vgl. 2.3.2.3). Entsprechend zur signifikanten Beschleunigung der diastolischen Ca^{2+} -Elimination

kam es, wie in Abbildung 3-5 veranschaulicht, bei einer Zunahme der Stimulationsfrequenz auf 2 Hz und 3 Hz im Vergleich zur 1-Hz-Stimulation zugleich zu einer signifikanten Verkürzung der kardiomyozytären Relaxationszeit, ohne dass der CaMKII-Inhibitor AS100105 darauf einen Einfluss hatte (1 Hz SL-Rt80 K: $0,346 \pm 0,009$ ms vs. AS: $0,322 \pm 0,010$ ms ($n = 92/14$ vs. $n = 93/14$); 2 Hz SL-Rt80 K: $0,194 \pm 0,006$ ms vs. AS: $0,189 \pm 0,005$ ms ($n = 58/11$ vs. $n = 60/11$); 3 Hz: SL-Rt80 K: $0,135 \pm 0,004$ ms vs. AS: $0,134 \pm 0,003$ ms ($n = 58/11$ vs. $n = 60/11$)).

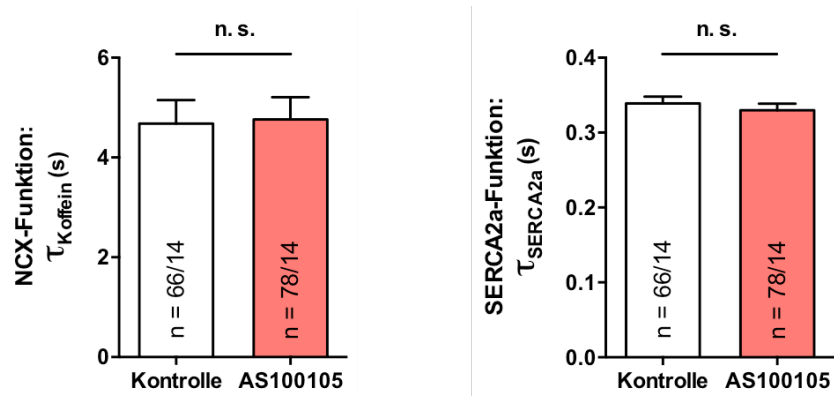


Abbildung 3-7: NCX- und SERCA2a-Funktion

Der CaMKII-Inhibitor AS100105 zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers (NCX) oder der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a). n = Kardiomyozyten/Mäuse

Abbildung 3-7 veranschaulicht den Einfluss von AS100105 auf die Funktion der Ca^{2+} -Transporter SERCA2a und NCX. Die NCX-Funktion wurde mittels koffeininduzierter Transienten untersucht (vgl. 2.3.2.3). Es zeigte sich kein Einfluss von AS100105 auf die Funktion dieses Ca^{2+} -Transporters (τ_{Koffein} K: $4,67 \pm 0,47$ s vs. AS: $4,76 \pm 0,45$ s ($n = 66/14$ vs. $n = 78/14$)). Unter Einbeziehung der Koffein-Messungen konnte zudem eine noch genauere Bestimmung der SERCA2a-Funktion durch Verrechnung von Transientenabfallskinetik bei 1 Hz und unter Koffein erfolgen, so dass der Anteil der NCX-Aktivität am Ca^{2+} -Transientenabfall bei 1 Hz herausgerechnet wurde (vgl. 2.3.2.3). Diese Berechnungen bestätigten, dass AS100105 keinen Einfluss auf die Funktion der SERCA2a hatte (τ_{SERCA2a} K: $0,339 \pm 0,009$ s vs. AS: $0,330 \pm 0,009$ s ($n = 66/14$ vs. $n = 78/14$)).

3.1.2.3 Post-Pausen-Zunahme

Die Zunahme der elektrisch stimulierten Ca^{2+} -Freisetzung nach einer Stimulationspause („Post-Pausen-Zunahme“) ist ein integratives Maß für die Fähigkeit des SRs, Ca^{2+} aufzunehmen und zu speichern (vgl. 2.3.2.3). AS100105 verbesserte signifikant die Post-Pausen-Zunahme der Ca^{2+} -Fluoreszenzamplitude (Amplitudenzunahme um $33,93 \pm 1,86$ %

(n = 39/11) gegenüber der vorangehenden basalen 1-Hz-Stimulation im Vergleich zu einer Amplitudenzunahme um $26,86 \pm 1,54 \%$ (n = 46/11) unter Kontrollbedingungen).

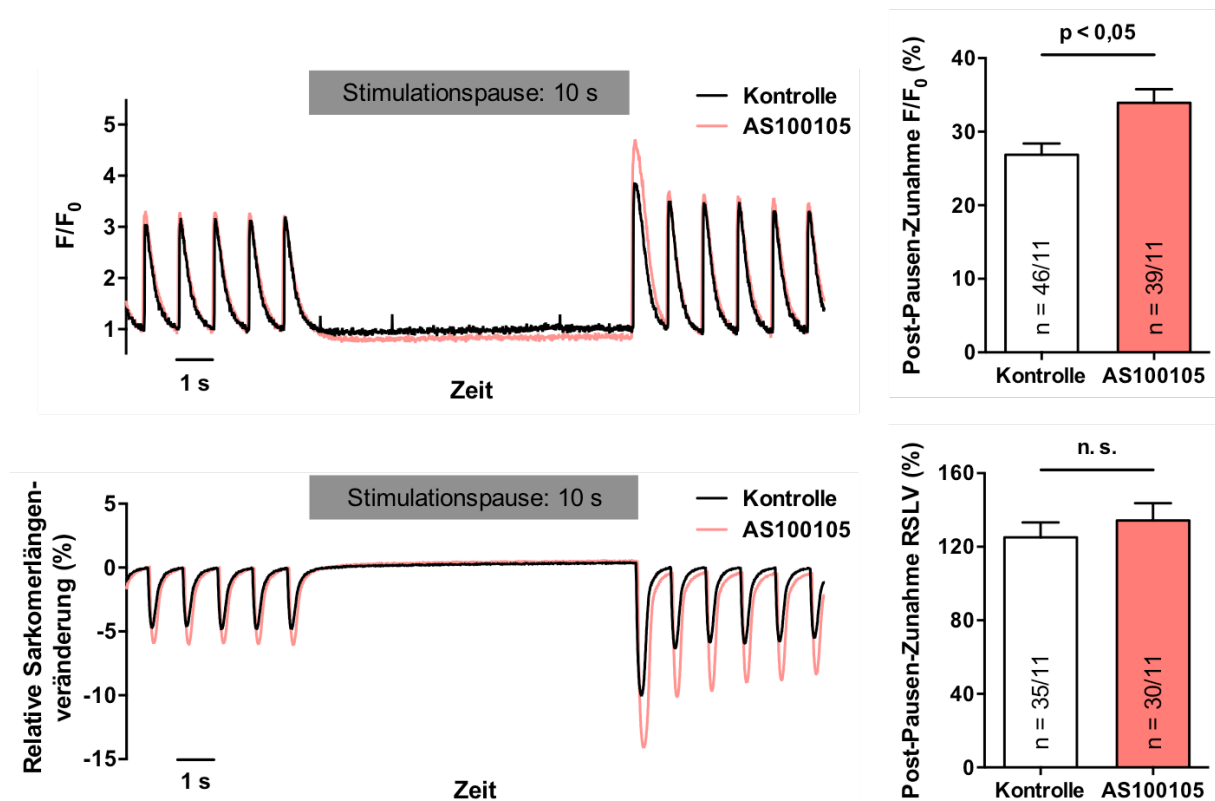


Abbildung 3-8: Post-Pausen-Zunahme von Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängenverkürzung

Illustrative Originalregistrierung des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals (links oben) und des Kontraktionsverhaltens (links unten) einer Herzmuskelzelle bei 1-Hz-Stimulation mit Stimulationspause von zehn Sekunden. Die Amplitudenzunahme des ersten Ca^{2+} -Transienten und der ersten Kontraktionskurve nach der Stimulationspause war unter Einwirkung von AS100105 stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Die Mittelwerte aller Messungen ergaben unter Einfluss von AS100105 eine signifikant höhere Post-Pausen-Zunahme der Ca^{2+} -Transienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (rechts oben), während sich die relative Sarkomerlängenverkürzung (RSLV) nach der Stimulationspause nur in der Tendenz verstärkte (rechts unten). n = Kardiomyozyten/Mäuse

Entsprechend zeigte sich auch die Kardiomyozytenkontraktion anhand der Zunahme der relativen Sarkomerlängenverkürzung nach der Stimulationspause unter AS100105 mit $134,31 \pm 9,41 \%$ (n = 30/11) tendenziell stärker als in der Kontrollgruppe ($125,09 \pm 8,13 \%$, n = 35/11), ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen. (Zu beachten ist hierbei, dass methodisch bedingt in beiden Gruppen gerade bei denjenigen Zellen mit der stärksten Kontraktilitätszunahme eine Kontraktilitäts-Messung nach der Pause nicht möglich war, da die Sarkomerlängen-Messung bei sehr starker Kontraktion durch Artefakte gestört wurde. Dieses betraf in beiden Gruppen etwa ein Viertel der Zellen. Möglicherweise wurde hierdurch der Einfluss von AS100105 auf die Kontraktilität unterschätzt.) Abbildung 3-8 zeigt die verstärkte Post-Pausen-Zunahme der Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängenverkürzung unter Einwirkung des CaMKII-Inhibitors AS100105 nach zehnssekündiger Stimulationspause.

3.1.2.4 SR Ca^{2+} -Gehalt

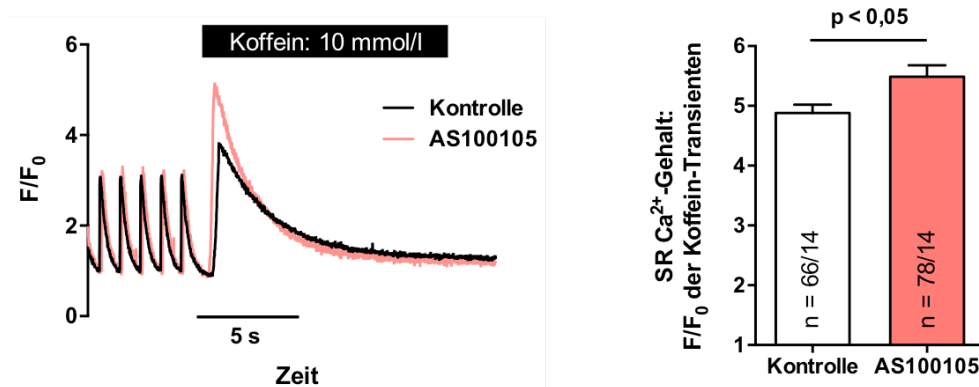


Abbildung 3-9: SR Ca^{2+} -Gehalt: Koffeininduzierter Ca^{2+} -Transient

Unter Einfluss des CaMKII-Inhibitors AS100105 zeigte sich in der Auswertung von koffeininduzierten Ca^{2+} -Transienten (links, illustrative Originalregistrierungen) der SR Ca^{2+} -Gehalt im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (rechts). n = Kardiomyozyten/Mäuse

Die Applikation von Koffein führte durch Öffnung der RyR2 zur vollständigen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol und zu einem entsprechenden Anstieg der aufgezeichneten zytosolischen Ca^{2+} -Fluoreszenz. Die Amplitude des koffeininduzierten Ca^{2+} -Transienten („Koffein-Transient“) konnte somit herangezogen werden, um den Ca^{2+} -Gehalt des SRs zu messen (vgl. 2.3.2.3). AS100105 führte zu einer signifikanten Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts. Das F/F₀ der Koffein-Transienten betrug in der Inhibitorgruppe $5,49 \pm 0,19$ (n = 78/14) im Vergleich zu $4,88 \pm 0,14$ (n = 66/14) in der Kontrollgruppe. Abbildung 3-9 zeigt den signifikant erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalt unter AS100105 und veranschaulicht durch Originalregistrierungen die erhöhte Amplitude des Koffein-Transienten in der Inhibitorgruppe.

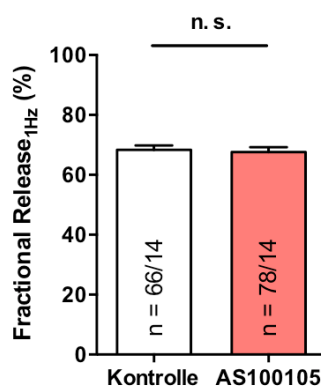


Abbildung 3-10: Fractional Release bei 1-Hz-Stimulation

Der Anteil der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR (in Bezug auf den anhand von Koffein-Transienten ermittelten SR Ca^{2+} -Gehalt) wurde bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz durch den CaMKII-Inhibitor AS100105 nicht beeinflusst. n = Kardiomyozyten/Mäuse

Anhand dieser Daten kann zudem die elektrisch stimulierte systolische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR ins Verhältnis zum SR Ca^{2+} -Gehalt gesetzt werden (vgl. 2.3.2.3). Dieses Fractional Release (d.h. die prozentuale systolische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR) wurde durch AS100105 nicht beeinflusst und betrug bei 1-Hz-Stimulation $67,61 \pm 1,65 \%$ ($n = 78/14$) in der Inhibitorgruppe und $68,31 \pm 1,52 \%$ ($n = 66/14$) in der Kontrollgruppe (Abbildung 3-11).

3.1.3 Auswirkungen von AS100105 auf das diastolische SR Ca^{2+} -Leck

Um das diastolische SR Ca^{2+} -Leck für Kardiomyozyten aus transgenen $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -überexprimierenden Mäusen zu bestimmen, wurden Versuche mit Tetracain durchgeführt. In ausreichender Konzentration führt Tetracain zum vollständigen Verschluss des RyR2 und verhindert damit den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR in das Zytosol. Durch Verwendung einer Na^+ - und Ca^{2+} -freien Lösung wurde dabei eine Ca^{2+} -Elimination nach extrazellulär über den NCX verhindert. Das Ausmaß der Abnahme der diastolischen Ca^{2+} -Fluoreszenz unter Einfluss von Tetracain konnte so als Maß für das diastolische SR Ca^{2+} -Leck verwendet werden (vgl. 2.3.3).

3.1.3.1 Tetracain-Shift

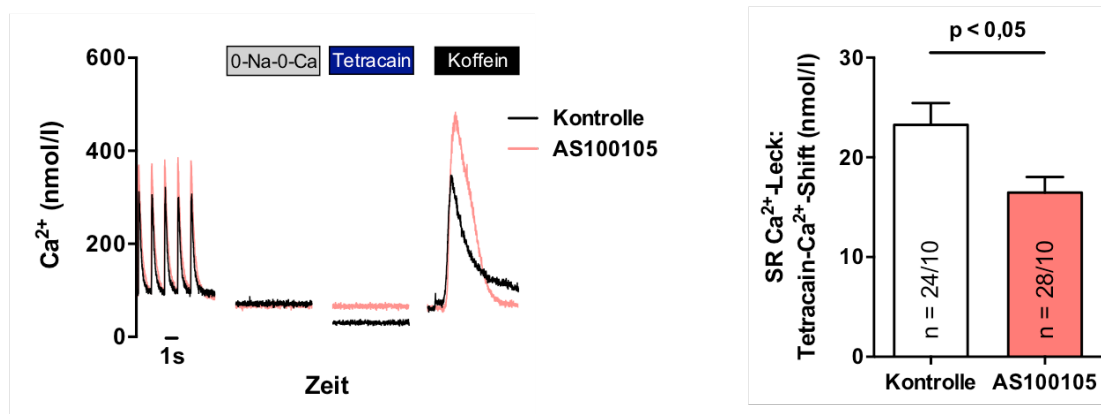


Abbildung 3-11: Tetracain- Ca^{2+} -Shift

Wie in den illustrativen Originalregistrierungen (links) dargestellt, kam es nach RyR2-Blockade mittels Tetracain unter CaMKII -Inhibition mit AS100105 zu einem deutlich geringeren Abfall des zytosolischen Ca^{2+} als in der Kontrollgruppe. Die Mittelwerte aller Messungen ergaben eine signifikante Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks unter AS100105 um 29,21 % (rechts). n = Kardiomyozyten/Mäuse

Der diastolische Ca^{2+} -Fluoreszenzabfall bei Tetracain-Applikation im Vergleich zur $0\text{-Na}^+0\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung („Tetracain-Shift“) verringerte sich unter Einfluss von AS100105. Die Ca^{2+} -Fluoreszenz reduzierte sich in der Kontrollgruppe auf ein F/F_0 Tetracain (vgl. 2.3.3.3) von $0,772 \pm 0,022$ ($n = 24/10$), während unter Einfluss von AS100105 eine signifikant geringere Reduktion der Ca^{2+} -Fluoreszenz (entsprechend einem verminderten SR Ca^{2+} -Leck) auf ein

$F/F_{0\text{ Tetracain}}$ von $0,840 \pm 0,016$ ($n = 28/10$) gemessen wurde. Auch die Umrechnung des diastolischen Ca^{2+} -Fluoreszenzabfalls in absolute Ca^{2+} -Werte („Tetracain- Ca^{2+} -Shift“) ergab ein signifikant niedrigeres SR Ca^{2+} -Leck von $16,46 \pm 1,58$ nmol/l in der Inhibitorgruppe im Vergleich zu $23,25 \pm 2,20$ nmol/l in der Kontrollgruppe. AS100105 konnte damit das absolute SR Ca^{2+} -Leck signifikant um 29,21 % reduzieren. Abbildung 3-11 zeigt die signifikante Abnahme des SR Ca^{2+} -Lecks unter AS100105 und veranschaulicht den stärkeren Tetracain- Ca^{2+} -Shift in der Kontrollgruppe durch Originalregistrierungen.

3.1.3.2 Leak-Load-Relationship

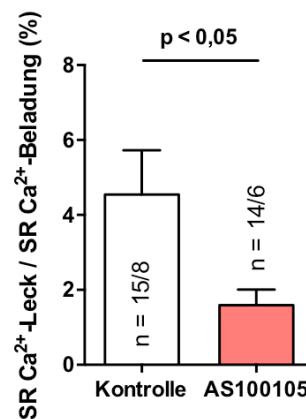


Abbildung 3-12: Leak-Load-Relationship

In der Inhibitorgruppe zeigte sich das diastolische SR Ca^{2+} -Leck auch in Relation zur SR Ca^{2+} -Beladung der Kardiomyozyten (ermittelt anhand von Koffein-Transienten) gegenüber der Kontrollgruppe signifikant um 64,93 % verringert. n = Kardiomyozyten/Mäuse

Für Kardiomyozyten in denen zusätzlich ein Koffein-Transient aufgezeichnet werden konnte, war es möglich das SR Ca^{2+} -Leck pro SR Ca^{2+} -Beladung zu berechnen („leak-load-relationship“, vgl. 2.3.3.3). Dies ist ein wichtiger Parameter, da das SR Ca^{2+} -Leck über die RyR2 stark vom SR Ca^{2+} -Gehalt abhängig ist (vgl. 1.4.1) und sich in den vorangehenden Untersuchungen in der Inhibitorgruppe ein signifikant vermehrter SR Ca^{2+} -Gehalt gezeigt hatte (vgl. 3.1.2.4). Wie in Abbildung 3-12 dargestellt, betrug das diastolische SR Ca^{2+} -Leck pro SR Ca^{2+} -Beladung in der Kontrollgruppe $4,55 \pm 1,18$ % ($n = 15/8$), während es unter AS100105 mit $1,59 \pm 0,42$ % ($n = 14/6$) signifikant geringer war. Dies entspricht einer Reduktion des SR Ca^{2+} -Lecks pro SR Ca^{2+} -Beladung bzw. einer Verbesserung der „Dichtigkeit“ der RyR2 von 64,93 % durch den CaMKII-Inhibitor AS100105.

3.2 Effekte von AS100105 in humanen Vorhofkardiomyozyten

3.2.1 Charakteristika der Patientinnen und Patienten

Die humanen atrialen Herzmuskelzellen stammten von 21 Patientinnen und Patienten mit einem Durchschnittsalter von 63,71 Jahren und einem Anteil von 85,71 % männlichen Patienten und 14,29 % weiblichen Patientinnen. Die OP-Indikation war in allen Fällen eine aortokoronare Bypass-Operation. In sechs Fällen wurde zusätzlich ein Eingriff an der Aorten- oder Mitralklappe durchgeführt. Weitere Informationen zu den Gewebespendeinnen und Gewebespendern finden sich in Tabelle 7-1 (vgl. 7.1, S. 94).

3.2.2 Auswirkungen von AS100105 auf das diastolische SR Ca^{2+} -Leck

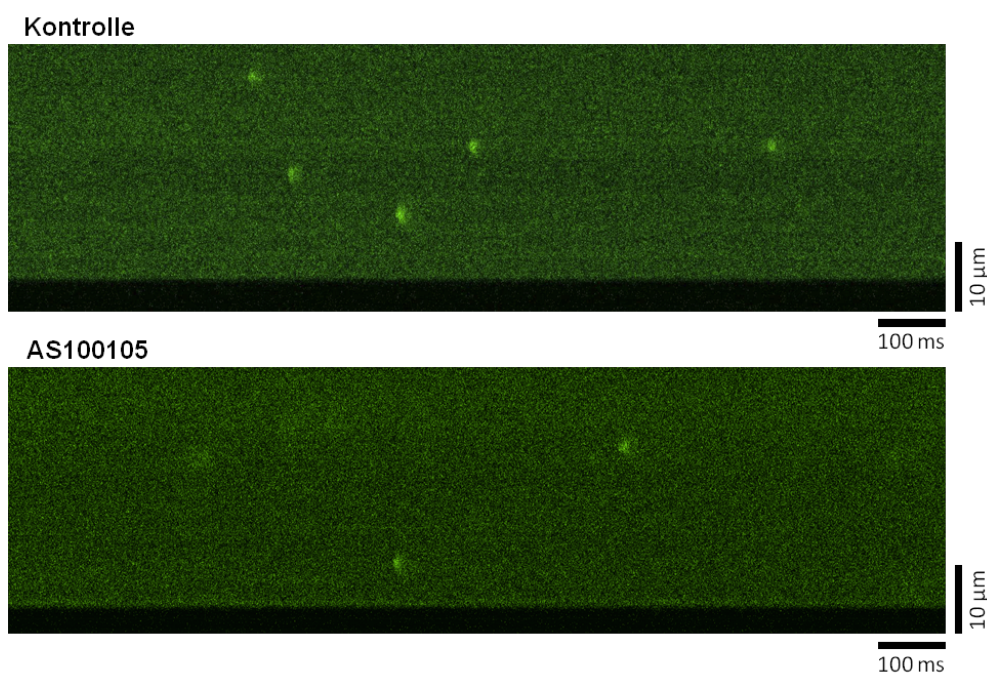


Abbildung 3-13: Konfokale Line-Scans mit Ca^{2+} -Sparks

Illustrative Originalregistrierungen konfokalmikroskopischer Messungen mit humanen atrialen Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (oben) und unter AS100105 (unten). Die CaMKII-Inhibition mit AS100105 reduzierte die Größe und die Frequenz der Ca^{2+} -Sparks. Helligkeit zur verbesserten Reproduktion um 20 % erhöht.

Um die Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks als Schlüsselergebnis der Versuche mit murinen Kardiomyozyten mit einer weiteren Methode auch für menschliche Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden mittels Konfokalmikroskopie Ca^{2+} -Sparks in atrialen humanen Kardiomyozyten quantitativ und qualitativ analysiert. In der Kontrollgruppe wurden 303 Zellen untersucht, von denen 97 Zellen Ca^{2+} -Sparks während der Dauer des konfokalen Line-Scans zeigten. Unter AS100105 waren es 102 „sparkende“ Zellen bei 329 untersuchten

Kardiomyozyten. Insgesamt wurden aus diesen Zellen 617 Ca^{2+} -Sparks in der Kontrollgruppe und 502 Ca^{2+} -Sparks in der Inhibitorgruppe analysiert (vgl. 2.4.2). Abbildung 3-13 illustriert die im Folgenden dargestellten Ergebnisse dieser Untersuchungen durch Originalregistrierungen von konfokalen Line-Scan-Bildern.

3.2.2.1 Ca^{2+} -Spark-Charakteristika

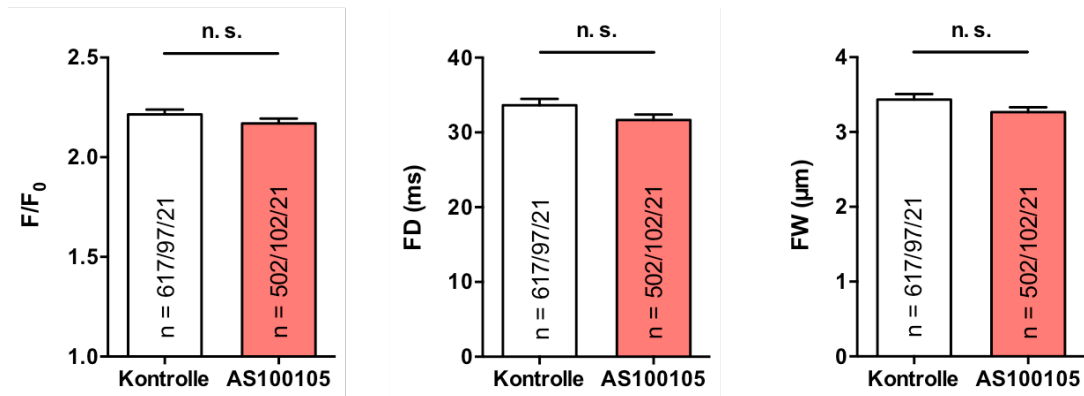


Abbildung 3-14: Amplitude, Dauer und Breite der Ca^{2+} -Sparks

Amplitude (F/F_0), zeitliche (FD) und räumliche Ausdehnung (FW) der gemessenen Ca^{2+} -Sparks zeigten sich unter Einfluss von AS100105 im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell verringert. n = Ca^{2+} -Sparks/Kardiomyozyten/Patientinnen und Patienten

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich die Ca^{2+} -Spark-Amplitude (F/F_0), die Ca^{2+} -Spark-Dauer (FD: „full duration“) und die räumliche Ausdehnung der Ca^{2+} -Sparks (FW: „full width“), wie in Abbildung 3-14 dargestellt, unter Einfluss des CaMKII-Inhibitors AS100105 tendenziell verringert, ohne jedoch Signifikanzniveau zu erreichen (F/F_0 K: $2,22 \pm 0,02$ vs. AS: $2,17 \pm 0,03$; FD K: $33,64 \pm 0,85$ ms vs. AS: $31,67 \pm 0,74$ ms; FW K: $3,43 \pm 0,07$ µm vs. AS: $3,27 \pm 0,07$ µm (für alle Messwerte: n = 617/97/21 vs. n = 502/102/21)).

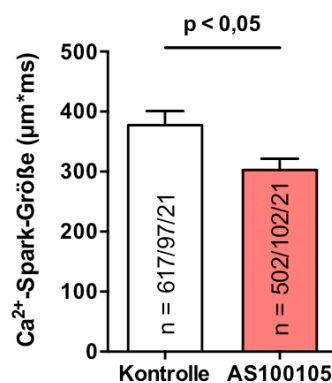


Abbildung 3-15: Ca^{2+} -Spark-Größe

Die CaMKII-Inhibition durch AS100105 führte zu einer signifikanten Reduktion der Ca^{2+} -Spark-Größe. n = Ca^{2+} -Sparks/Kardiomyozyten/Patientinnen und Patienten

Es zeigte sich, dass die tendenzielle Verringerung dieser drei Messparameter in der Inhibitorgruppe in einer signifikanten Reduktion der Ca^{2+} -Spark-Größe (berechnet durch Multiplikation von Amplitude, Dauer und Breite der Ca^{2+} -Sparks, vgl. 2.4.2.3) resultierte (Abbildung 3-15). Unter CaMKII-Inhibition mittels AS100105 verringerte sich die Ca^{2+} -Spark-Größe signifikant um 19,77 % (Ca^{2+} -Spark-Größe K: $377,4 \pm 23,3 \mu\text{m} \cdot \text{ms}$ vs. AS: $302,8 \pm 18,7 \mu\text{m} \cdot \text{ms}$ ($n = 617/97/21$ vs. $n = 502/102/21$)).

3.2.2.2 Ca^{2+} -Spark-Frequenz

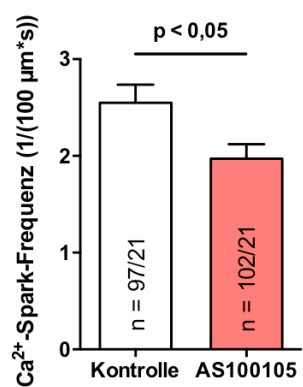


Abbildung 3-16: Ca^{2+} -Spark-Frequenz

Die Ca^{2+} -Spark-Frequenz wurde durch den Einfluss des CaMKII-Inhibitors AS100105 signifikant reduziert. n = Kardiomyozyten/Patientinnen und Patienten

Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte AS100105 zu einer signifikanten Reduktion der Ca^{2+} -Spark-Frequenz um 22,63 %: Während unter Kontrollbedingungen $2,55 \pm 0,19$ Ca^{2+} -Sparks pro 100 μm pro Sekunde ($n = 97/21$) erfasst wurden, kam es unter AS100105 mit $1,97 \pm 0,15$ Ca^{2+} -Sparks pro 100 μm pro Sekunde ($n = 102/21$) zu einer signifikanten Verringerung ihres Auftretens (Abbildung 3-16).

3.2.2.3 SR Ca^{2+} -Leck

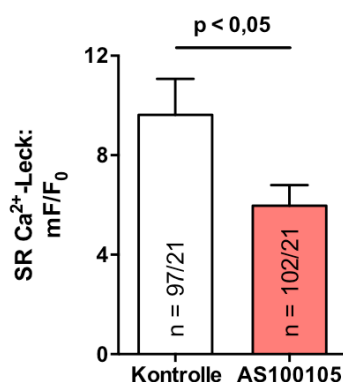


Abbildung 3-17: Diastolisches SR Ca^{2+} -Leck in humanen Kardiomyozyten

Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte AS100105 zu einer signifikanten Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks um 37,92 %. n = Kardiomyozyten/Patientinnen und Patienten.

Aus den Ca^{2+} -Spark-Parametern ließ sich das gesamte SR Ca^{2+} -Leck der untersuchten Zellen errechnen (vgl. 2.4.2.3). Entsprechend der unter AS100105 reduzierten durchschnittlichen Größe der einzelnen Ca^{2+} -Sparks und ihres selteneren Auftretens (niedrigere Ca^{2+} -Spark-Frequenz) führte AS100105 in den humanen Vorhofkardiomyozyten insgesamt zu einer deutlichen Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks um 37,92 %: In der Kontrollgruppe betrug das SR Ca^{2+} -Leck im Mittel $9,62 \pm 1,45 \text{ mF/F}_0$ ($n = 97/21$), wohingegen sich unter AS100105 ein signifikant geringeres Ca^{2+} -Leck von $5,97 \pm 0,83 \text{ mF/F}_0$ ($n = 102/21$) ergab (Abbildung 3-17).

3.2.2.4 Anteil sparkender Zellen

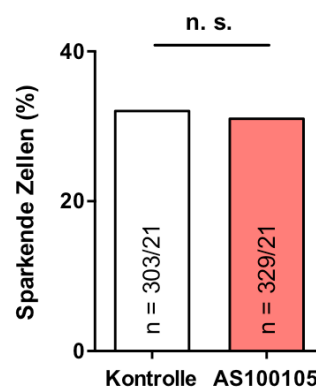


Abbildung 3-18: Anteil sparkender Zellen

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Inhibitor- und Kontrollgruppe in Bezug auf den Anteil sparkender Zellen. n = Kardiomyozyten/Patientinnen und Patienten

Unter Kontrollbedingungen wurden in 97 von insgesamt 303 Kardiomyozyten (d.h. 32,01 % der Zellen) Ca^{2+} -Sparks gemessen. In der Inhibitorgruppe wiesen 102 von insgesamt 329 ausgewerteten Kardiomyozyten (d.h. 31,00 % der Zellen) Ca^{2+} -Sparks auf. Der Anteil sparkender Zellen (Abbildung 3-18) wurde damit durch AS100105 nicht beeinflusst.

3.2.3 Auswirkungen von AS100105 auf zelluläre Arrhythmie-Korrelate

In humanen atrialen Kardiomyozyten wurde der Einfluss von AS100105 auf das Auftreten von spontanen zellulären Ca^{2+} -Freisetzungen (SCaFs, Abbildung 3-19) untersucht. Derartig umfangreiche Ca^{2+} -Freisetzungen stellen zelluläre Arrhythmie-Korrelate dar (vgl. 2.4.2). (Zu beachten ist, dass aufgrund der in 2.4.2.3 diskutierten Gründe Zellen mit SCaF von der Spark-Auswertung auszuschließen waren und dort auch entsprechend nicht für die Gesamtzahl der untersuchten Zellen mitgezählt wurden.)

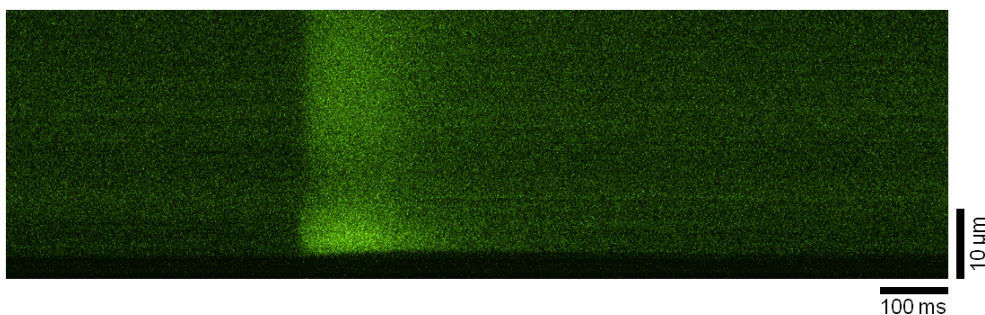


Abbildung 3-19: Spontane zelluläre Ca^{2+} -Freisetzung (SCaF)

Originalregistrierung einer spontanen zellulären Ca^{2+} -Freisetzung (sichtbar als Anstieg der Ca^{2+} -Fluoreszenz) bei der konfokalmikroskopischen Messung einer humanen atrialen Herzmuskelzelle. Derartige SCaFs wurden als arrhythmogene Ereignisse gewertet. Helligkeit zur verbesserten Reproduktion um 30 % erhöht.

SCaFs wurden durch den CaMKII-Inhibitor AS100105 effektiv unterdrückt. Der Anteil von Kardiomyozyten, in denen überhaupt SCaFs auftraten (arrhythmogene Zellen) lag in der Kontrollgruppe bei 29,70 % und reduzierte sich unter AS100105 signifikant auf 19,95 % der Zellen. Zudem reduzierte AS100105 in den arrhythmogenen Zellen die Frequenz, mit der SCaFs auftraten: In der Kontrollgruppe traten in 128 arrhythmogenen Zellen $0,448 \pm 0,029$ ($n = 128/21$) SCaFs pro Sekunde auf, während die Häufigkeit der SCaFs in der Inhibitorgruppe in 82 arrhythmogenen Zellen mit $0,313 \pm 0,023$ SCaFs pro Sekunde ($n = 82/21$) signifikant geringer ausfiel. Wie in den Mittelwerten in Abbildung 3-20 dargestellt, reduzierte AS100105 damit sowohl insgesamt den Anteil arrhythmogener Kardiomyozyten als auch die Frequenz der SCaFs in diesen Zellen und damit deren Potenzial eine Arrhythmie induzieren zu können.

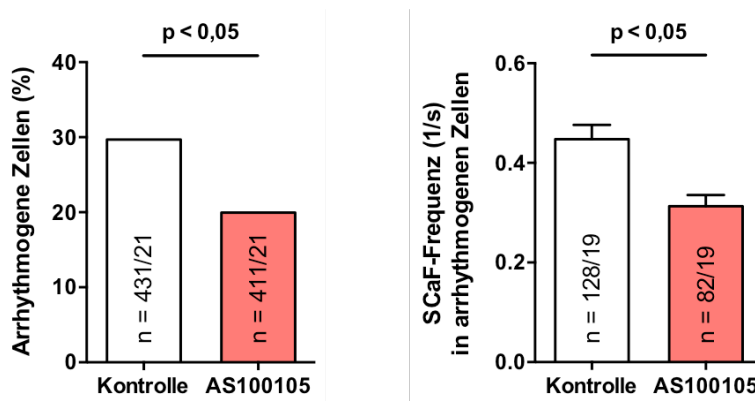


Abbildung 3-20: Arrhythmogene Zellen und SCaF-Frequenz in diesen Zellen

Unter AS100105 traten in 82 von 411 untersuchten Zellen SCaFs auf im Vergleich zu 128 von 431 Zellen in der Kontrollgruppe. AS100105 führte damit zu einer signifikanten Reduktion des Anteils arrhythmogener Zellen (links). In diesen arrhythmogenen Zellen reduzierte AS100105 zudem signifikant die Frequenz des Auftretens von SCaFs (rechts). n = Kardiomyozyten/Patientinnen und Patienten

Insgesamt wurden in 431 untersuchten Zellen unter Kontrollbedingungen 440 SCaFs aufgezeichnet, während unter AS100105 in 411 Zellen 197 SCaFs registriert wurden. Die

Häufigkeit des Auftretens dieser arrhythmogenen Ereignisse in Bezug auf alle Zellen wurde damit durch den CaMKII-Inhibitor AS100105 signifikant auf nur $0,062 \pm 0,008$ SCaFs pro Sekunde ($n = 411/21$) im Vergleich zu $0,133 \pm 0,013$ SCaFs pro Sekunde in der Kontrollgruppe ($n = 431/21$) vermindert, woraus sich eine Reduktion der SCaF-Frequenz von 53,05 % ergibt (Abbildung 3-21).

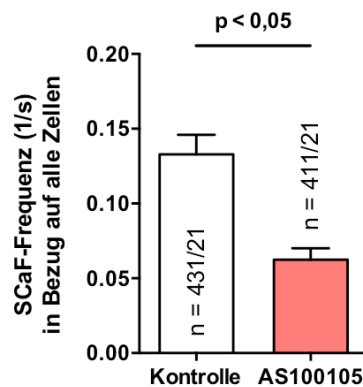


Abbildung 3-21: Häufigkeit von SCaFs in Bezug auf alle untersuchten Zellen

Unter Kontrollbedingungen traten in 431 Zellen insgesamt 440 SCaFs pro 7,68 s dauerndem Scan-Intervall auf im Vergleich zu 197 SCaFs in 411 Zellen unter AS100105. Der CaMKII-Inhibitor AS100105 reduzierte damit das Auftreten von SCaFs signifikant um 53,05 %. n = Kardiomyozyten/Patientinnen und Patienten

4 Diskussion

Die Forschung der letzten Jahre hat die Inhibition der CaMKII als vielversprechende neue Therapieoption für die Behandlung von Herzinsuffizienz [104] und kardialen Arrhythmien [10] in den Fokus gerückt. Bisher etablierte CaMKII-Inhibitoren wurden allerdings als reine Forschungssubstanzen konzipiert und sind mit schwerwiegenden Limitationen behaftet, aufgrund derer sie für den klinischen Einsatz ungeeignet sind. AS100105 gehört zur ersten Generation von CaMKII-Inhibitoren, die mit der Zielsetzung einer therapeutischen Anwendung an Patientinnen und Patienten entwickelt wurden [11].

Als wesentlicher Ansatzpunkt einer therapeutischen Inhibition der CaMKII gelten Störungen der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz und kardialen Arrhythmien. Die gesteigerte Aktivität der CaMKII führt bei diesen Erkrankungen insbesondere zu einem pathologisch erhöhten diastolischen SR Ca^{2+} -Leck, was als entscheidender CaMKII-bedingter Mechanismus bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz angesehen wird [5, 6, 87, 88] und zudem einen wichtigen Pathomechanismus bei der Entstehung von kardialen Arrhythmien darzustellen scheint [8, 9, 97].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die Effekte des neuartigen CaMKII-Inhibitors AS100105 auf den kardiomyozytären Ca^{2+} -Haushalt untersucht. Die Versuche wurden an Kardiomyozyten von transgenen CaMKII δ_{C} -überexprimierenden Mäusen durchgeführt, in denen die Auswirkungen einer akuten CaMKII-Inhibition durch AS100105 besonders gut erkennbar sein sollten. Das Herzgewicht-zu-Körpergewicht-Verhältnis der Tiere zeigte sich im Verhältnis zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren mehr als verdoppelt (vgl. 3.1.1), was den bekannten Phänotyp dieses Mausmodells von schwerer kontraktile Dysfunktion und ausgeprägter kardialer Hypertrophie widerspiegelt [5]. In der CaMKII δ_{C} -transgenen Maus findet sich im Vergleich zum Wildtyp eine dreifach gesteigerte Aktivität der CaMKII [91]. Dies entspricht in etwa dem Umfang der CaMKII-Aktivitätssteigerung bei humaner Herzinsuffizienz [103], so dass es sich bei der CaMKII δ_{C} -überexprimierenden Maus um ein klinisch relevantes Modell der Herzinsuffizienz handelt. Um darüber hinaus Erkenntnisse in Bezug auf einen potenziellen klinischen Einsatz der Substanz zur Behandlung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien im Menschen zu gewinnen, wurden weitere Versuche mit AS100105 an humanen Vorhofkardiomyozyten durchgeführt.

4.1 AS100105 verstärkt die systolische Ca^{2+} -Freisetzung und Kontraktilität bei basaler Stimulation

Die Menge an Ca^{2+} , die während der Systole in das Zytosol von Kardiomyozyten freigesetzt wird, bestimmt das Ausmaß der Aktivierung der kontraktilen Myofilamente (vgl. 1.2.1). Unter basaler Stimulationsfrequenz von 1 Hz bewirkte AS100105 in Kardiomyozyten von CaMKII δ C-überexprimierenden Mäusen eine signifikante Verbesserung der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung und der kardiomyozytären Kontraktilität (vgl. 3.1.2.1). Als potenzieller Wirkstoff zur Behandlung der Herzinsuffizienz demonstrierte der neuartige CaMKII-Inhibitor damit einen wünschenswerten positiv inotropen Effekt.

Eine gesteigerte systolische Ca^{2+} -Freisetzung kann durch vermehrten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle oder durch erhöhte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR bedingt sein. Der L-Typ- Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle hat bei Mäusen entsprechend zur diastolischen Ca^{2+} -Elimination nach extrazellulär über den NCX (vgl. 1.2.2) einen Anteil von ca. 9 % an der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung, während etwa 90 % des freigesetzten Ca^{2+} aus dem SR stammen [125]. Damit trägt der L-Typ- Ca^{2+} -Einstrom nur in geringem Umfang zur Gesamtmenge des systolisch freigesetzten Ca^{2+} bei. Von einer CaMKII-Inhibition wäre zudem durch reduzierte Phosphorylierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle eher eine Verminderung des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle zu erwarten (vgl. 1.3.3). Die erhöhten systolischen Ca^{2+} -Transienten unter AS100105 lassen sich daher vor allem auf eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR zurückführen. AS100105 beeinflusste dabei nicht die fraktionelle systolische Ca^{2+} -Freisetzung („fractional release“): Der Anteil des Ca^{2+} , der während der Systole aus dem SR in das Zytosol freigesetzt wurde, blieb unverändert. Grundlage der verbesserten systolischen Ca^{2+} -Freisetzung und der hierdurch gesteigerten kardiomyozytären Kontraktilität ist vielmehr eine Zunahme des SR Ca^{2+} -Gehalts unter AS100105 (vgl. 3.1.2.4). Eine signifikante Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts um 12,43 % durch AS100105 konnte anhand von koffeininduzierten Ca^{2+} -Transienten nach basaler elektrischer Stimulation bei 1 Hz nachgewiesen werden. Effekte des CaMKII-Inhibitors an den SR Ca^{2+} -Freisetzungskanälen (RyR2) scheinen in Bezug auf die systolische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR dagegen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Verminderung des diastolischen Ca^{2+} -Verlusts aus dem SR unter AS100105 (vgl. 3.1.3 und 3.2.2) deutet daraufhin, dass der neuartige CaMKII-Inhibitor generell eher eine verringerte Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 bewirkt. In Kombination mit einem potenziell reduzierten Ca^{2+} -Einstrom über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle unter CaMKII-Inhibition würde dies eine Verminderung des Fractional Release erwarten

lassen. Das unveränderte Fractional Release unter AS100105 lässt sich dadurch erklären, dass eine Zunahme des SR Ca^{2+} -Gehalts isoliert betrachtet zu einem erhöhten Fractional Release führt [131]. Somit scheinen sich unter AS100105 diese beiden Mechanismen gegenseitig auszugleichen, so dass ein balancierter Effekt auf das Fractional SR Ca^{2+} Release resultiert.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beobachteten Li et al. (1997) ursprünglich einen negativen Effekt der CaMKII-Inhibition durch KN-93 auf die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und die Kontraktilität von Herzmuskelzellen. SR Ca^{2+} -Gehalt und Fractional Release zeigten sich in ihrer Studie vermindert. Allerdings wurden die zugehörigen Versuche an ventrikulären Herzmuskelzellen von gesunden Frettchen durchgeführt, die daher keine pathologischen Veränderungen des Ca^{2+} -Haushalts aufwiesen [62], so dass die zu erwartenden positiven Effekte der CaMKII-Inhibition in insuffizientem Myokard, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Kardiomyozyten von CaMKII δ c-überexprimierenden Mäusen mit Herzinsuffizienz und erhöhtem SR Ca^{2+} -Leck [5], nicht zum Tragen kommen konnten. Besonders zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass auch im insuffizienten humanen Myokard bereits ein positiver Effekt der akuten CaMKII-Inhibition auf die systolische Ca^{2+} -Freisetzung und Kontraktilität in Verbindung mit einer Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts unter Verwendung experimenteller CaMKII-Inhibitoren nachgewiesen werden konnte [6].

Bei den Stimulationsfrequenzen von 2 Hz und 3 Hz wurde in der vorliegenden Arbeit unter AS100105 im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Veränderung der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung oder der Kontraktilität festgestellt (vgl. 3.1.2.1). Für diese Stimulationsfrequenzen wurde der SR Ca^{2+} -Gehalt nicht untersucht. Da es aufgrund der höheren Stimulationsfrequenz nicht zu einem vollständigen Abfall der Ca^{2+} -Transienten während der Diastole kam, ist eine aussagekräftige Beurteilung der Effekte von AS100105 auf die Inotropie bei diesen Frequenzen allerdings auch nicht möglich. Spekuliert werden kann aber, dass die Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks durch AS100105 bei Verkürzung der Dauer der Diastole mit steigender Stimulationsfrequenz zunehmend an Bedeutung verliert und der SR Ca^{2+} -Gehalt im Vergleich zur Kontrollgruppe somit nicht mehr potent genug erhöht werden kann, um eine verbesserte systolische Ca^{2+} -Freisetzung und Kontraktilität bei der nächsten Stimulation zu induzieren.

4.2 AS100105 erhöht den SR Ca^{2+} -Gehalt durch Verbesserung der Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR

Die Effizienz mit der Ca^{2+} im sarkoplasmatischen Retikulum eingespeichert werden kann, wird als Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit bezeichnet. Sie ist bei Herzinsuffizienz stark vermindert [77]. Der Einfluss von AS100105 auf die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR wurde durch Quantifizierung der Post-Pausen-Zunahme (Steigerung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude nach zehnssekündiger Stimulationspause, vgl. 2.3.2.3) untersucht. Der neuartige CaMKII-Inhibitor führte in Kardiomyozyten von transgenen CaMKII δ_{C} -überexprimierenden Mäusen zu einer signifikant verbesserten Post-Pausen-Zunahme der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude (vgl. 3.1.2.3). Der erhöhte SR Ca^{2+} -Gehalt und die verstärkte systolische Ca^{2+} -Freisetzung lassen sich damit auf die verbesserte Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR unter AS100105 zurückführen.

Nach der Stimulationspause kommt es infolge der gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung auch zu einer verstärkten Kontraktilität der Zellen. Unter Einfluss des CaMKII-Inhibitors AS100105 war diese Post-Pausen-Zunahme der Sarkomerlängenverkürzung im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell, nicht jedoch signifikant, verbessert (vgl. 3.1.2.3). Im Vergleich zum Niveau vor der Pause vermochte eine Zunahme der Amplitude des ersten Ca^{2+} -Transienten nach der Stimulationspause um 26,86 % (33,93 % in der Inhibitorgruppe) das Ausmaß der Sarkomerlängenverkürzung nach der Pause bereits in der Kontrollgruppe mehr als zu verdoppeln (125,09 % Zunahme im Vergleich zu 134,31 % in der Inhibitorgruppe). Es kann vermutet werden, dass bei einer Kontraktion dieser Stärke (welche unter den stabilen Bedingungen der durchgehenden basalen Stimulation sonst nicht erreicht wird) bereits in der Kontrollgruppe ein hoher Anteil der Myofilamente durch Ca^{2+} aktiviert wurde. Die signifikant stärkere Post-Pausen-Zunahme der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude unter AS100105 konnte sich aus diesem Grunde womöglich nicht mehr in gleichem Maße in einer Steigerung der kardiomyozytären Kontraktilität niederschlagen.

Das während der Systole aus dem SR freigesetzte bzw. über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in das Zytoplasma einströmende Ca^{2+} wird über die SERCA2a zurück in das SR befördert oder über den NCX nach extrazellulär eliminiert (vgl. 1.2.2). Unter CaMKII-Inhibition mit AS100105 zeigten sich SERCA2a- und NCX-Funktion unverändert (3.1.2.2). Ausgeschlossen werden kann damit, dass eine vermehrte Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR durch die SERCA2a oder eine verminderte Ca^{2+} -Elimination nach extrazellulär durch den NCX die Ursache für die verbesserte Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR unter AS100105 darstellen. Der

verbesserten SR Ca^{2+} -Beladung zugrunde zu liegen scheint vielmehr der durch AS100105 signifikant reduzierte diastolische Ca^{2+} -Verlust aus dem SR (vgl. 3.1.3, 3.2.2).

4.3 Grundlage des positiv inotropen Effekts von AS100105 ist die Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks

Das diastolische SR Ca^{2+} -Leck wurde in den Kardiomyozyten der CaMKII δ_{C} -überexprimierenden Mäuse nach der Methode von Shannon et al. (2002) mithilfe des RyR2-Blockers Tetracain untersucht [85]. Der neuartige CaMKII-Inhibitor AS100105 bewirkte eine signifikante Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks. Hervorzuheben ist hierbei, dass AS100105 das SR Ca^{2+} -Leck zu senken vermochte, obwohl es unter Einfluss des neuartigen CaMKII-Inhibitors zugleich zu einer Steigerung des SR Ca^{2+} -Gehalts kam und eine Zunahme der SR Ca^{2+} -Beladung per se zu einer vermehrten Leckage von Ca^{2+} aus dem SR führen würde [85]. Tatsächlich konnte AS100105 den prozentualen Anteil des SR Ca^{2+} -Lecks an der SR Ca^{2+} -Beladung („*leak-load-relationship*“) signifikant um 64,93 % verbessern (vgl. 3.1.3.2). Der verringerte Ca^{2+} -Verlust aus dem SR konnte so direkt zur Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts beitragen. Durch den verbesserten SR Ca^{2+} -Gehalt erhöht sich die Menge an Ca^{2+} , die infolge eines Aktionspotenzials zur Aktivierung der Myofilamente aus dem SR ausgeschüttet werden kann, so dass die Reduktion des SR Ca^{2+} -Lecks letztlich die wesentliche Ursache für den positiv inotropen Effekt von AS100105 in den CaMKII δ_{C} -transgenen Kardiomyozyten darstellt. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Inhibition der konstitutiv vermehrten CaMKII in den herzinsuffizienten CaMKII δ_{C} -überexprimierenden Mäusen nicht nur zu einer Reduktion des SR Ca^{2+} -Lecks, sondern infolge auch zu einer Verbesserung des SR Ca^{2+} -Gehalts und der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung führen kann.

Die Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks als Schlüsselergebnis der akuten CaMKII-Inhibition durch AS100105 konnte für Vorhofkardiomyozyten von Menschen mit einer weiteren Methode bestätigt werden, in welcher das Auftreten von spontanen diastolischen „ Ca^{2+} -Sparks“ (unsynchronisierte diastolische Ca^{2+} -Freisetzungseignisse aus RyR2-Clustern, vgl. 1.4.2) als Maß für das SR Ca^{2+} -Leck untersucht wurde. Der CaMKII-Inhibitor reduzierte in diesen konfokalmikroskopischen Untersuchungen (vgl. 2.4.2) bei unverändertem Anteil von „sparkenden Zellen“ (vgl. 3.2.2.4) signifikant die Größe (vgl. 3.2.2.1) und vor allem die Frequenz (vgl. 3.2.2.2) der Ca^{2+} -Sparks. Die signifikante Reduktion der Ca^{2+} -Spark-Größe (als Produkt aus Amplitude, Dauer und Breite der Ca^{2+} -Sparks) um 19,77 % ergab sich

dabei aus der Kombination der jeweils tendenziell verringerten Amplitude, Dauer und Breite der Ca^{2+} -Sparks unter AS100105, obwohl der Einfluss der Substanz auf diese Parameter im Einzelnen betrachtet jeweils kein Signifikanzniveau erreichte (vgl. 3.2.2.1). Zusammen führten eine reduzierte Häufigkeit des Auftretens von Ca^{2+} -Sparks (d.h. ihrer Frequenz) und die Verringerung ihrer individuellen Größe durch AS100105 zu einer signifikanten Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks um 37,92 % (vgl. 3.2.2.3). Damit ist dieser neuartige CaMKII-Inhibitor auch in humanen Kardiomyozyten effektiv in der Lage, das SR Ca^{2+} -Leck zu reduzieren und somit einen potenziell positiv inotropen Effekt auszuüben.

Die Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks durch AS100105 ist kongruent mit den bekannten Effekten der etablierten CaMKII-Inhibitoren, welche als reine Forschungssubstanzen entwickelt wurden (vgl. 1.6.1). KN-93 zeigte einen ähnlich deutlichen Effekt auf die Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks sowohl in CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäusen [5, 8] als auch in humanem Myokard [6, 9, 97]. AIP vermochte das SR Ca^{2+} -Leck in vergleichbarer Weise in Kardiomyozyten von Kaninchen [132] und in insuffizientem humanen Myokard [106] zu reduzieren.

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass AS100105 auch in Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen das (in diesen gesunden Zellen ohnehin niedrige) SR Ca^{2+} -Leck noch ein wenig weiter zu reduzieren vermag. Anders als in den transgen die CaMKII überexprimierenden Kardiomyozyten mit pathologisch erhöhtem SR Ca^{2+} -Leck hatte diese geringe Reduktion des SR Ca^{2+} -Lecks jedoch keinen Einfluss auf den SR Ca^{2+} -Gehalt oder die systolische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und somit also auch keinen positiv inotropen Effekt. [121]

4.4 AS100105 reduziert das Auftreten von zellulären Arrhythmie-Korrelaten

Diastolisches SR Ca^{2+} -Leck kann über den elektrogenen Austausch des ins Zytosol gelangenden Ca^{2+} nach extrazellulär via NCX (Elimination von einem Ca^{2+} -Ion im Austausch gegen drei Na^+ -Ionen) transiente Einwärtsströme induzieren, durch welche es zu Depolarisationen der Zellmembran und dem Auftreten von Arrhythmien kommen kann (vgl. 1.5.2). Da AS100105 sowohl in CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäusen als auch in humanen Vorhofkardiomyozyten zu einer starken Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks führte, kann unter dem Einfluss der Substanz auch ein verringertes Auftreten von Arrhythmie-induzierenden Ereignissen erwartet werden. Um diese Hypothese zu testen, wurde in den humanen Vorhofkardiomyozyten das Auftreten von Arrhythmie-Korrelaten in Form von

spontanen zellulären Ca^{2+} -Freisetzungen (SCaFs) quantitativ ausgewertet. SCaFs waren bei der konfokalmikroskopischen Messung über die gesamte Breite des gemessenen Zellabschnitts sichtbar. Im Gegensatz zu Ca^{2+} -Sparks (vgl. 1.4.2) sind SCaFs damit nicht lokal begrenzt, sondern das Korrelat einer Aktivierung einer Vielzahl benachbarter RyR2-Cluster in der gesamten Herzmuskelzelle. SCaFs repräsentieren damit eine massive potenziell arrhythmogene Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Der CaMKII-Inhibitor AS100105 reduzierte in humanen Vorhofkardiomyozyten signifikant den Anteil der Zellen, die SCaFs enthielten. Zugleich vermochte AS100105 die Häufigkeit dieser Arrhythmie-Korrelate in betroffenen Zellen signifikant zu vermindern (vgl. 3.2.3).

In anderen Arbeiten wurden abweichende Nomenklaturen verwendet, um spontane zelluläre Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR zu beschreiben, denen entsprechend zu den SCaFs ein arrhythmogenes Potenzial zugeschrieben wurde. Curran et al. (2010) beschrieben CaMKII-abhängige Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR in Form von „ Ca^{2+} -Waves“. Aufgrund des resultierenden Na^+ -Einstroms in die Zelle über den NCX wurden diese Ereignisse in Zusammenhang mit potenziell arrhythmogenen späten Nachdepolarisationen (DAD, vgl. 1.5.2) gebracht. Durch CaMKII-Inhibition mit KN-93 konnte das Auftreten von Ca^{2+} -Waves nach β -adrenerger Stimulation in gesunden und insuffizienten Kardiomyozyten von Kaninchen deutlich reduziert werden [129]. Sag et al. (2009) beschrieben spontane SR Ca^{2+} -Freisetzungsereignisse mit konsekutiver Kontraktion in Kardiomyozyten von CaMKII δ C-überexprimierenden Mäusen als nicht-stimulierte Ereignisse („*nonstimulated events*“, NSE) und konnten unter CaMKII-Inhibition mit KN-93 eine signifikante Reduktion dieser Ereignisse nachweisen [8]. Voigt et al. (2012) beobachteten in humanen Vorhofkardiomyozyten von Patientinnen und Patienten mit Vorhofflimmern arrhythmogene spontane Ca^{2+} -Freisetzungsereignisse („*arrhythmogenic spontaneous Ca^{2+} release events*“, SCaEs), die ebenfalls von einem Na^+ -Einstrom über den NCX begleitet wurden und zur Auslösung von DADs führten. KN-93 konnte auch hier das Auftreten der Arrhythmie-Korrelate signifikant vermindern, wobei der CaMKII-Inhibitor zugleich in der Lage war, das diastolische SR Ca^{2+} -Leck signifikant zu reduzieren [97]. Die in dieser Arbeit für den neuen CaMKII-Inhibitor AS100105 beobachtete Suppression von zellulären Arrhythmie-Korrelaten entspricht damit den im Vorfeld für andere CaMKII-Inhibitoren ermittelten (potenziell) antiarrhythmischen Effekten, wobei der wesentliche Mechanismus hierfür in der Reduktion des SR Ca^{2+} -Lecks zu liegen scheint. Da jedoch auch Ionen-Transporter wie L-Typ- Ca^{2+} -, Na^+ - und K^+ -Kanäle in Verdacht stehen CaMKII-abhängig die zelluläre Arrhythmogenität zu

beeinflussen (vgl. 1.5.2), könnten weitere Effekte der CaMKII-Inhibition, die im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit untersucht wurden, zu dem beobachteten Effekt beitragen.

4.5 AS100105 zeigt keine negativen Effekte auf grundlegende Mechanismen der elektromechanischen Kopplung

4.5.1 Aufrechterhaltung einer positiven Kraft-Frequenz-Beziehung

Henry Pickering Bowditch demonstrierte 1871 an isolierten Froschherzen erstmals die Zunahme der myokardialen Kontraktionskraft bei steigender Stimulationsfrequenz [133]. Im Sinne einer positiven Kraft-Frequenz-Beziehung („*force frequency relationship*“, FFR) ermöglicht dieser „Bowditch-Effekt“ bei zunehmender Herzfrequenz die Erhöhung der kardialen Auswurfleistung. Mit steigender Herzfrequenz gelangt über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle mehr Ca^{2+} in die Zellen [134]. Zugleich wird über den Anstieg des intrazellulären Na^{+} -Gehalts und die verkürzte Dauer der Diastole die Ca^{2+} -Elimination über den NCX reduziert bzw. der Ca^{2+} -Einstrom über diesen Transporter gefördert. Es resultiert eine Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Menge mit höherer Ca^{2+} -Aufnahme in das SR. Bei nachfolgenden Stimulationen erhöht sich dadurch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, wodurch es zur verstärkten Aktivierung der Myofilamente und damit zum Anstieg der Kontraktionskraft kommt [117]. Eine positive FFR konnte bei größeren Säugetieren [135, 136] und für gesundes Myokard im Menschen [79] nachgewiesen werden.

Bei Herzinsuffizienz reagiert der Organismus auf das verminderte kardiale Auswurfvolumen mit einer Erhöhung der Herzfrequenz. Im Gegensatz zum physiologischen Bowditch-Effekt führt der kardiomyozytäre Ca^{2+} -Verlust und die eingeschränkte Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR im insuffizienten Myokard jedoch zu einer negativen FFR, wodurch die kardiale Auswurfleistung bei steigender Herzfrequenz weiter sinkt [77, 79].

In den untersuchten Kardiomyozyten der transgenen CaMKII δ_{C} -überexprimierenden Mäuse zeigte sich über die Stimulationsfrequenzen von 1 Hz, 2 Hz und 3 Hz eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung, die auch unter Einfluss des CaMKII-Inhibitors AS100105 erhalten blieb (vgl. 3.1.2.1). Damit ließ sich zumindest für das untersuchte Tiermodell und die verwendete Inhibitorkonzentration demonstrieren, dass AS100105 die Kraft-Frequenz-Beziehung im Herzen nicht beeinträchtigt. Bei einer Stimulationsfrequenz von 3 Hz entsprach die kardiomyozytäre Kontraktilität unter CaMKII-Inhibition mit AS100105 dem Niveau der Kontrollgruppe. Die leichte Abflachung des Anstiegs der Kraft-Frequenz-Kurve unter

AS100105 (vgl. 3.1.2.1, Abbildung 3-4) ist daher wohl in erster Linie auf die signifikant erhöhte Kontraktilität bei basaler 1-Hz-Stimulation zurückzuführen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten damit nicht darauf hin, dass die Kraft-Frequenz-Beziehung im Myokard wesentlich durch die Aktivität der CaMKII reguliert wird. Im Gegensatz dazu hatten einige bisherige Untersuchungen nahegelegt, dass die CaMKII im Rahmen ihrer frequenzabhängigen Aktivierbarkeit (vgl. 1.3.2) eine wichtige Rolle für die Optimierung der Kontraktionskraft bei Frequenzerhöhungen spielen könnte, indem sie die Ca^{2+} -induzierte- Ca^{2+} -Freisetzung positiv beeinflusst. Li et al (1997) konnten zeigen, dass die Aktivität der CaMKII die systolische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR auch bei konstantem Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und konstantem SR Ca^{2+} -Gehalt zu erhöhen vermochte [62]. Auch dies deutet darauf hin, dass die CaMKII-bedingte Phosphorylierung der RyR2-Proteine zu einer Steigerung ihrer Aktivität und Offenwahrscheinlichkeit führt. Nach genetischer Ablation der entscheidenden Phosphorylierungsstelle der CaMKII an den RyR2-Proteinen an Ser-2815 in transgenen S2815A-Mäusen konnten Kushnir et al. (2010) nachweisen, dass die Kraftentwicklung infolge einer Frequenzsteigerung abgeschwächt wurde [68]. Zusätzlich scheint auch die CaMKII-bedingte Phosphorylierung von Phospholamban die FFR positiv zu beeinflussen, da hierdurch die Ca^{2+} -Wiederaufnahme über die SERCA2a beschleunigt wird und so mehr Ca^{2+} aus dem SR für die systolische Freisetzung zur Verfügung steht (vgl. 1.3.3). Wu et al. (2012) zeigten, dass die CaMKII-Inhibition mit AC3-I in isolierten perfundierten Mäuseherzen zu einer Beeinträchtigung der frequenzabhängigen Kraftentwicklung führte. In Phospholamban-Knockout-Mäusen wurde zudem eine starke Einschränkung der FFR nachgewiesen, welche durch Inhibition der CaMKII nicht weiter beeinträchtigt wurde [69]. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen dagegen die Vermutung, dass CaMKII-unabhängige regulatorische Effekte z. B. an Phospholamban einen entscheidenden Einfluss auf die Kraft-Frequenz-Beziehung im Herzen ausüben könnten.

Demgegenüber hatten Sossalla et al. (2010) zeigen können, dass die negative FFR in insuffizientem Myokard des Menschen durch Inhibition der CaMKII mit KN-93 wieder in eine positive FFR umgekehrt werden konnte [6]. Ergänzende Versuche zu den Effekten von AS100105 auf die gestörte Kraft-Frequenz-Beziehung wären daher wünschenswert, um zu untersuchen, ob auch diese Substanz die physiologische Steigerung der Auswurfleistung des Herzens im insuffizienten humanen Myokard wiederherzustellen vermag.

4.5.2 Keine Beeinträchtigung der diastolischen Ca^{2+} -Elimination und der frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation

Die Geschwindigkeit der kardiomyozytären Relaxation wird maßgeblich durch die Aktivität der Ca^{2+} -Transporter SERCA2a und NCX beeinflusst, die das zytosolische Ca^{2+} zurück in das SR befördern bzw. nach extrazellulär eliminieren (vgl. 1.2.2). Bereits unter basaler 1-Hz-Stimulation wurde die Aktivität der beiden Transporter nicht durch AS100105 beeinflusst (vgl. 3.1.2.2).

In Kardiomyozyten von herzinsuffizienten CaMKII δ_{C} -transgenen Mäusen [5] wie auch in insuffizienten humanen Kardiomyozyten [80] ist eine Veränderung des Verhältnisses der Aktivität dieser beiden Transporter zugunsten des NCX bekannt, was zu einem Ca^{2+} -Verlust aus der Zelle und damit zu nachteiligen Auswirkungen auf die systolische Funktion des Herzmuskels führt. Allerdings scheint andererseits die Steigerung der Aktivität des NCX bei Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der diastolischen Funktion des Herzens zu spielen [137]. Die Kardiomyozyten werden so womöglich vor einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung bewahrt, zu der es aufgrund der verminderten SERCA2a-Aktivität [80, 81] und des verstärkten diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks [5, 6, 86] kommen könnte. Bisher wurde kein direkter Einfluss der CaMKII auf den NCX gezeigt, so dass für die akute CaMKII-Inhibition durch AS100105 auch keine veränderte Aktivität des Ca^{2+} -Transporters zu erwarten gewesen wäre. Indirekt wären jedoch Einflüsse denkbar (z. B. vermittelt durch Effekte der CaMKII-Inhibition auf den späten Natriumstrom [64] und damit die zytosolische Na^+ -Konzentration). Die SERCA2a wird dagegen durch CaMKII-bedingte Phosphorylierung von Phospholamban in ihrer Aktivität gefördert (vgl. 1.3.3). Passend dazu konnten Kohlhaas et al. (2006) nachweisen, dass in Kaninchen-Kardiomyozyten mit akuter Überexpression der CaMKII durch adenoviral vermittelten Gentransfer die akute CaMKII-Inhibition mit KN-93 zu einer signifikanten Verlangsamung der Zellrelaxation führte [88]. Dagegen fanden Sag et al. (2009), in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, keinen Einfluss der akuten CaMKII-Inhibition mit KN-93 auf die Kardiomyozytenrelaxation bei transgenen CaMKII δ_{C} -überexprimierenden Mäusen [8]. Womöglich spielen dosisabhängige Effekte eine Rolle oder es überwiegt aufgrund langfristiger adaptiver Prozesse in diesem Genotyp der regulierende Einfluss anderer Regulationsenzyme auf die Aktivität der SERCA2a. So könnte eine verstärkte Aktivität von Phosphatasen bereits unter Kontrollbedingungen einen geringen Phosphorylierungsgrad von Phospholamban bewirken, so dass dem positiv lusitropen Effekt der CaMKII ohnehin keine große Bedeutung zukäme (vgl. 1.4.1). Eine weitere Erklärung

könnte aber auch in speziesabhängigen Unterschieden des Ca^{2+} -Haushalts zu finden sein. Ergebnisse von Sossala et al. (2010) bestätigen einen eher geringen Einfluss der akuten CaMKII-Inhibition auf die diastolische Ca^{2+} -Elimination. Bei Muskelstreifen von humanem insuffizienten Ventrikelmuskard wurden keinerlei Veränderungen der Relaxationskinetik unter CaMKII-Inhibition mit KN-93 festgestellt [6].

Die frequenzabhängige Beschleunigung der kardialen Relaxation („*frequency dependent acceleration of relaxation*“, FDAR) ermöglicht eine ausreichend schnelle diastolische Relaxation und damit Füllung der Herzkammern bei steigender Herzfrequenz [138]. In Kardiomyozyten von CaMKII δ_c -überexprimierenden Mäusen zeigte sich die diastolische Relaxation der Kardiomyozyten (gemessen anhand von Rt80 und FDAR-ratio) in der Inhibitorgruppe unverändert (vgl. 3.1.2.2). Die FDAR wurde durch den neuartigen CaMKII-Inhibitor AS100105 damit nicht beeinträchtigt. Ein möglicher Einfluss der CaMKII auf die FDAR wird kontrovers diskutiert. Zunächst war eine Beeinträchtigung oder Aufhebung der FDAR durch CaMKII-Inhibitoren beobachtet worden, was erste wichtige Hinweise auf einen engen Zusammenhang zwischen CaMKII-Aktivität und FDAR lieferte [62, 72]. Durch eine Aktivitätszunahme bei steigender Herzfrequenz kommt es zu einer erhöhten CaMKII-bedingten Phosphorylierung von Phospholamban an Thr-17 (vgl. 1.3.2 und 1.3.3). Die resultierende Verstärkung der Aktivität der SERCA2a wurde zunächst als entscheidender Mechanismus der FDAR postuliert [57, 139]. Versuche an Phospholamban-Knockout-Mäusen belegen dagegen, dass es sich dabei zumindest nicht um den einzigen Mechanismus handeln kann, mit dem die CaMKII die FDAR beeinflusst. Trotz fehlender Expression von Phospholamban konnte in diesem Mausmodell bei Inhibition der CaMKII weiterhin eine Beeinträchtigung der FDAR beobachtet werden [39, 69, 138]. Huke und Bers (2007) konnten nachweisen, dass die Phosphorylierung von Phospholamban und von RyR2-Rezeptoren durch die CaMKII bei Steigerung der Stimulationsfrequenz im Vergleich zum schnellen Abschluss der FDAR erst mit einer zeitlichen Verzögerung eintritt, weshalb die FDAR nicht von den genannten Phosphorylierungsvorgängen abhängig zu sein scheint [140]. Unter diesem Gesichtspunkt liefern Ergebnisse von Guilbert et al. (2016) eine bessere Erklärung für den Zusammenhang von CaMKII-Aktivität und FDAR. Sie konnten nachweisen, dass die chronische Inhibition der CaMKII in vivo zu einer reduzierten Phosphorylierung von Troponin I mit resultierender Aufhebung der FDAR und diastolischer Dysfunktion führte [66]. Statt der indirekten Beeinflussung des Ca^{2+} -Haushalts über die kardiomyozytären Ca^{2+} -Transporter könnte also ein direkter Einfluss der CaMKII auf die Myofilamente für die FDAR

verantwortlich sein, indem eine Phosphorylierung von Troponin I die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente vermindert und so eine Dissoziation von Ca^{2+} während der Diastole begünstigt. Im Gegensatz zu diesen deutlichen Hinweisen auf einen Zusammenhang zwischen CaMKII-Aktivität und FDAR konnte übereinstimmend zu den Ergebnissen dieser Arbeit in weiteren Studien keinerlei Einfluss von CaMKII-Inhibitoren auf die FDAR nachgewiesen werden [141, 142]. Hervorzuheben sind dabei die Versuche von Sossalla et al. (2010), in denen unter CaMKII-Inhibition mit KN-93 auch in insuffizientem humanen Myokard eine intakte FDAR nachgewiesen wurde [6]. Derartige Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es wichtige CaMKII-unabhängige Mechanismen gibt, die der FDAR zugrunde liegen.

4.6 Perspektiven der therapeutischen Anwendung von AS100105 bei Herzinsuffizienz und kardialen Arrhythmien

4.6.1 Potenzial von AS100105 als Therapieoption bei Herzinsuffizienz

Die Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks infolge der CaMKII-Inhibition mit AS100105, als Schlüsselergebnis dieser Arbeit, konnte sowohl für murine Kardiomyozyten mit transgener CaMKII δ_{C} -Überexpression als auch für humane Vorhofkardiomyozyten nachgewiesen werden. Aufgrund des verringerten Ca^{2+} -Verlusts aus dem SR verbesserte sich in Kardiomyozyten von transgenen CaMKII δ_{C} -überexprimierenden Mäusen die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR und es kam zu einer Steigerung des SR Ca^{2+} -Gehalts. Bei basaler Stimulationsfrequenz von 1 Hz konnten daraus resultierende positiv inotrope Effekte des neuartigen CaMKII-Inhibitors beobachtet werden. Dabei ergaben sich keine störenden Einflüsse einer CaMKII-Inhibition durch AS100105 auf die elektromechanische Kopplung. Die wichtigsten Ca^{2+} -eliminierenden Transporter SERCA2a und NCX wurden durch AS100105 nicht wesentlich in ihrer Aktivität beeinflusst, so dass die diastolische Funktion der Kardiomyozyten nicht beeinträchtigt wurde. Zudem zeigten sich wichtige frequenzabhängige physiologische Effekte der elektromechanischen Kopplung wie FFR und FDAR intakt. Dies ist in Bezug auf eine potenzielle medikamentöse Anwendung von besonderer Bedeutung, da die Aufrechterhaltung einer ausreichenden diastolischen Herzkammerfüllung und die Erhöhung des systolischen Auswurfvolumens bei steigender Herzfrequenz (als entscheidende Reaktionsmechanismen bei akutem Stress) so auch unter CaMKII-Inhibition mit AS100105 gewährleistet blieben.

Der neuartige CaMKII-Inhibitor besitzt daher das Potenzial, pathologischen Veränderungen

des kardiomyozytären Ca^{2+} -Haushalts entgegenzuwirken, die zur Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Herzinsuffizienz führen. Das Ausbleiben störender Einflüsse auf die elektromechanische Kopplung liefert erste Anhaltspunkte für eine prinzipielle Verträglichkeit von AS100105. Von dieser Seite her erscheinen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Bezug auf einen potenziellen therapeutischen Einsatz von AS100105 zur Behandlung der Herzinsuffizienz vielversprechend.

Ein pathologisch gesteigertes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck stellt eine wesentliche Beeinträchtigung des kardiomyozytären Ca^{2+} -Haushalts dar, die zur Ausprägung des Krankheitsbildes einer Herzinsuffizienz führt [5, 6, 86]. Die zugrunde liegende Hyperphosphorylierung des kardialen RyR2 scheint dabei sowohl durch die CaMKII als auch durch die Proteinkinase A vermittelt zu werden, wobei eine Vielzahl von Ergebnissen darauf hindeutet, dass in erster Linie die CaMKII das SR Ca^{2+} -Leck verursacht (vgl. 1.4.2). Respress et al. (2012) und Benkusky et al. (2007) lieferten hierfür entscheidende Belege: Das Knock-in-Mausmodell S2815A mit Inaktivierung der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser-2815 am RyR2 zeigte sich bei einer Erhöhung der Nachlast durch transverse aortale Konstriktion (TAC) vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz geschützt. Das SR Ca^{2+} -Leck der Kardiomyozyten war deutlich geringer als bei den Wildtyp-Geschwistertieren der Kontrollgruppe und der SR Ca^{2+} -Gehalt zeigte sich entsprechend erhöht [101]. Im Gegensatz dazu wurde nach genetischer Ablation der PKA-Phosphorylierungsstelle am RyR2 an Ser-2809 im Mausmodell S2809A nach TAC eine unveränderte Progression des kardialen Remodelling in Richtung Herzinsuffizienz ohne wesentliche Veränderungen des kardiomyozytären Ca^{2+} -Haushalts nachgewiesen [92]. In einer aktuelleren Studie konnte zudem an isolierten Muskelstreifen von insuffizientem humanen Myokard im direkten Vergleich gezeigt werden, dass ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck bei Herzinsuffizienz mit CaMKII-bedingter jedoch nicht mit PKA-bedingter Hyperphosphorylierung des RyR2 assoziiert war [106]. Da zudem die Dichte an β -Rezeptoren bei Herzinsuffizienz reduziert ist [95], könnte sich die Inhibition der CaMKII als Therapieform bei Herzinsuffizienz im Gegensatz zur Inhibition des PKA-Signalwegs durch die etablierten β -Blocker als vorteilhaft erweisen. Da bereits die β -Blocker-Therapie bei Herzinsuffizienz eine Wirksamkeit bewiesen hat, lässt sich für eine medikamentöse CaMKII-Inhibition durchaus ein noch höheres therapeutisches Potenzial erwarten. Womöglich hängt die Effektivität einer medikamentösen CaMKII-Inhibition dabei jedoch von der Genese der Herzinsuffizienz ab. Respress et al. (2012) konnten zeigen, dass die Phosphorylierung des entscheidenden RyR2-Angriffspunkts der CaMKII an Ser-2815 bei

Patientinnen und Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz erhöht war, während dies bei Betroffenen mit ischämischer Herzinsuffizienz nicht der Fall war. Entsprechend wurde bei Mäusen infolge der S2815A-Mutation (s. o.) im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren bei Herzinsuffizienz durch Druckbelastung nach TAC ein signifikant geringeres SR Ca^{2+} -Leck und ein höherer SR Ca^{2+} -Gehalt beobachtet. Diese protektiven Effekte für die kardiomyozytäre Kontraktilität konnten dagegen nicht beobachtet werden, wenn die Herzinsuffizienz durch einen experimentellen Myokardinfarkt induziert wurde [101]. Im Rahmen der Vielfalt der Ursachen und Ausprägungsformen der Herzinsuffizienz (vgl. 1.1.3) sind daher Unterschiede in der Wirksamkeit der medikamentösen CaMKII-Inhibition in Bezug auf bestimmte Patientinnen- und Patientengruppen vorstellbar und sollten Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

4.6.2 Potenzial von AS100105 als Therapieoption bei Arrhythmien

Das prinzipielle antiarrhythmische Potenzial von AS100105 konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis einer Reduktion von diastolischen Ca^{2+} -Verlusten aus dem SR in Form von Ca^{2+} -Sparks (vgl. 3.2.2) und insbesondere auch durch die Suppression des Auftretens von arrhythmogenen SCaFs unter Einfluss des neuartigen CaMKII-Inhibitors (vgl. 3.2.3) demonstriert werden.

Eine medikamentöse CaMKII-Inhibition könnte sich gegenüber einer Blockierung des PKA-Signalwegs durch die etablierten β -Blocker neben der Herzinsuffizienz auch in Bezug auf die Unterdrückung von Arrhythmien als vorteilhaft oder gar überlegen erweisen. Curran et al. (2010) zeigten im Rahmen einer β -adrenergen Stimulation von gesunden und insuffizienten Kardiomyozyten von Kaninchen ein deutlich reduziertes Auftreten von arrhythmogenen Ca^{2+} -Waves nach CaMKII-Inhibition mit KN-93, nicht jedoch nach Inhibition der PKA mittels H89 [129]. Auch in einer Versuchsreihe von Voigt et al. (2012) wurden die Arrhythmie-Korrelate in humanen atrialen Kardiomyozyten von Patientinnen und Patienten mit Vorhofflimmern durch KN-93 signifikant reduziert, während eine Inhibition der PKA hierfür ineffektiv war [97].

Die Ergebnisse von Respress et al. (2012) konnten belegen, dass das erhöhte diastolische SR Ca^{2+} -Leck in insuffizienten Kardiomyozyten maßgeblich durch die CaMKII-bedingte Hyperphosphorylierung der kardialen RyR2-Proteine an Ser-2815 verursacht wird [101]. Der gleiche Pathomechanismus scheint auch bei der Induktion von Arrhythmien eine wichtige Rolle zu spielen. Diesen Nachweis erbrachten van Oort et al. (2010) unter Verwendung des

Mausmodells S2815D, in welchem Ser-2815 an den RyR2-Proteinen konstitutiv aktiviert ist, um eine Hyperphosphorylierung durch die CaMKII zu simulieren. In den Kardiomyozyten der S2815D-Mäuse wurde ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck in Form einer gesteigerten Ca^{2+} -Spark-Frequenz nachgewiesen. Infolge einer β -adrenergen Provokation oder einer programmierten elektrischen Stimulation entwickelten die Mäuse anhaltende ventrikuläre Tachykardien und erlitten einen plötzlichen Herztod. Junge S2815D-Mäuse wiesen zudem nach transversaler aortaler Konstriktion (TAC) mit konsekutiver Induktion einer Herzinsuffizienz eine erhöhte Prädisposition für den plötzlichen (durch Arrhythmie induzierten) Herztod auf. Im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren zeigten sich S2815A-Mäuse dagegen nach TAC aufgrund der genetischen Ablation der CaMKII-Phosphorylierungsstelle an den RyR2-Proteinen vor der Entwicklung von potenziell lebensbedrohlichen Arrhythmien geschützt [143].

Da der plötzliche Herztod aufgrund von ventrikulären Tachykardien eine der häufigsten Todesursachen bei Herzinsuffizienz darstellt (vgl. 1.1.2), unterstreicht der antiarrhythmogene Effekt von AS100105 die Bedeutung dieses neuartigen CaMKII-Inhibitors für die Behandlung der Herzinsuffizienz. Die Fähigkeit zur Reduktion arrhythmogener Korrelate durch AS100105 wurde allerdings in der vorliegenden Arbeit an humanen Kardiomyozyten von Patientinnen und Patienten nachgewiesen, welche aufgrund einer koronaren Herzkrankheit eine Bypass-Operation erhielten und damit nicht zwangsläufig an einer Herzinsuffizienz litten (vgl. 3.2.1 und 7.1, Tabelle 7-1). Zudem handelte es sich um atriale Kardiomyozyten, während die letalen Arrhythmien bei Herzinsuffizienz fast immer ventrikulärer Natur sind. Andererseits lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass sich der antiarrhythmogene Effekt von AS100105 nicht nur auf Arrhythmien im Rahmen der Herzinsuffizienz beschränkt. Unterstützend hierzu konnten Chelu et al. (2009) im genetisch veränderten Mausmodell $\text{RyR2}^{\text{R176Q/+}}$ ein vermehrtes Auftreten von Vorhofflimmern mit einer verstärkten CaMKII-bedingten Phosphorylierung des RyR2 in Verbindung bringen. Sowohl eine pharmakologische als auch eine genetische CaMKII-Inhibition konnten dabei die Induktion von Vorhofflimmern durch Reduktion des pathologisch erhöhten SR Ca^{2+} -Lecks verhindern. Eine vermehrte CaMKII-bedingte Phosphorylierung des RyR2 wurde im Rahmen dieser Studie auch in Vorhofbiopsien von Patientinnen und Patienten mit Vorhofflimmern nachgewiesen [144]. Für etablierte CaMKII-Inhibitoren wurde zudem bereits eine Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks in Kardiomyozyten von Vorhofflimmer-Patientinnen und -Patienten nachgewiesen [9] und es konnte gezeigt werden, dass die akute CaMKII-Inhibition in diesem Gewebe zu einer Reduktion von Arrhythmie-Korrelaten führt [97].

Zudem wurde das Potenzial der CaMKII-Inhibition zur Verhinderung von Arrhythmien bei kardialer Azidose in Langendorff-perfundierten Mäuseherzen demonstriert, in denen KN-93 das Auftreten von ventrikulären Tachykardien verminderte [145]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine antiarrhythmogene Wirksamkeit einer CaMKII-Inhibition bei genetischen Arrhythmie-Syndromen wie der katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie [146, 147] und dem Long-QT-Syndrom-2 [148, 149]. Somit besteht für die Inhibition der CaMKII mit AS100105 sowohl für die gefährlichen Arrhythmien im Rahmen einer Herzinsuffizienz als auch bei weiteren kardialen Arrhythmieformen ein therapeutisches Potenzial, welches in weiteren Untersuchungen näher beleuchtet werden sollte.

4.6.3 Pharmakologische Aspekte und mögliche Limitationen einer Therapie mit AS100105

Der Angriffspunkt des Inhibitors an der ATP-Bindungsstelle ist insofern vorteilhaft, als dass die CaMKII so unabhängig von ihrer Aktivierungsform inhibiert werden kann (vgl. 1.6.2). Eine Inhibition der Daueraktivität der CaMKII nicht nur nach Autophosphorylierung des Enzyms, sondern auch nach GlycNAcylation bei erhöhten Glukosespiegeln und ROS-bedingter Aktivierung (z. B. im Rahmen eines erhöhten Einflusses von Angiotensin II), könnte einen Beitrag leisten zur Unterbindung der Progression und Modulation der Herzinsuffizienz durch Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus und arterielle Hypertension (vgl. 1.1.3 und 1.3.2). Die deutlich nachweisbaren Effekte der CaMKII-Inhibition mit AS100105 suggerieren dabei, dass die Konkurrenz mit millimolaren zytosolischen Konzentrationen von ATP, denen der neuartige CaMKII-Inhibitor ausgesetzt ist [11], aufgrund der hohen Potenz von AS100105 (vgl. 1.6.2) in Bezug auf die verwendeten Messkonzentrationen keinen limitierenden Faktor darstellt. Allerdings bietet der Angriffspunkt von AS100105 zugleich die Gefahr der Interaktion mit über 500 weiteren Proteinkinasen, deren ATP-Bindungsstelle eine ähnliche Konformation aufweist [11], wodurch eine Vielzahl CaMKII-unabhängiger intrazellulärer Signalwege beeinflusst werden könnte. Bislang konnten nachteilige Interaktionen mit anderen zellulären Signalwegen nicht nachgewiesen werden. Vor einer möglichen Anwendung der Substanz am Menschen sollten jedoch weitreichendere Untersuchungen zu deren Ausschluss durchgeführt werden. Selbst wenn AS100105 eine günstige sehr hohe Selektivität in Bezug auf die CaMKII aufweisen sollte, gilt es zu bedenken, dass die CaMKII auch in vielen anderen Organen exprimiert wird und dort wichtige Funktionen wahrnimmt. So wird der α - und β -Isoform der CaMKII im Gehirn, deren Expression insbesondere im Hippocampus auffällig hoch ist [150], eine

wichtige Funktion bei Lernprozessen zugeschrieben [151, 152]. Die ZNS-Gängigkeit eines therapeutischen CaMKII-Inhibitors sollte dementsprechend ausgeschlossen oder durch strukturelle Anpassungen des Moleküls verhindert werden.

In-vivo-Versuche, wie sie in Bezug auf etablierte CaMKII-Inhibitoren wie AC3-I [112] oder KN-93 [8] bereits durchgeführt wurden, könnten den nächsten Schritt zur Beurteilung der Verträglichkeit des CaMKII-Inhibitors darstellen. Sie wären zugleich geeignet, um die orale Bioverfügbarkeit von AS100105 zu prüfen, da eine orale Applikationsform bei der dauerhaften Therapie von chronischen Erkrankungen wie Herzinsuffizienz und Arrhythmien natürlich wünschenswert wäre. Zudem sollten die grundsätzliche Pharmakokinetik und die Metabolisierung der Substanz näher aufgeklärt werden. Dabei ist hervorzuheben, dass bisherige Versuche zur CaMKII-Inhibition im Herzen bislang exklusiv in Kleintiermodellen und dabei fast ausschließlich in Mäusen durchgeführt wurden. Daher sollten die bisherigen Ergebnisse zunächst in den Menschen näherstehenden Großtiermodellen überprüft werden, bevor eine therapeutische Anwendung bei Patientinnen und Patienten erwogen werden kann. Dabei wird zu beachten sein, dass CaMKII-Inhibitoren in spezifischen Situationen schädlich sein könnten. So besteht bei Herzinsuffizienz ein erhöhtes Risiko für kardiale Schockzustände. Die Aktivität der CaMKII scheint dabei entscheidend zur Erholung von einer intrazellulären Azidose beizutragen, wie sie im Rahmen einer kardialen Ischämie auftritt [153]. Ergebnisse von Neef et al. (2013) legen nahe, dass eine sichere Anwendung einer Inhibition der CaMKII bei einer Azidose nicht gewährleistet sein könnte. Kardiomyozyten von transgenen CaMKII δ -Knockout-Mäusen zeigten unter basalen physiologischen Bedingungen eine weitgehend intakte systolische Funktion. Während einer Azidose verschlechterte sich jedoch die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten, was auf die beobachtete Einschränkung der Ca²⁺-Wiederaufnahme in das SR und eine Verminderung des SR Ca²⁺-Gehalts zurückgeführt wurde. Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen zeigte sich die Erholung von der Azidose in den Kardiomyozyten der transgenen Mäuse deutlich beeinträchtigt. Anzumerken ist dabei, dass unter physiologischen Bedingungen trotz des unveränderten SR Ca²⁺-Gehalts bereits eine Beeinträchtigung der diastolischen Ca²⁺-Wiederaufnahme in das SR bei den Kardiomyozyten der CaMKII δ -Knockout-Mäuse beobachtet wurde [122]. Der neuartige CaMKII-Inhibitor AS100105 zeigte dagegen unter physiologischen Bedingungen keine Einschränkungen der Ca²⁺-Wiederaufnahme in das SR. Da von einem CaMKII-Inhibitor im Gegensatz zum Knockout-Modell keine vollständige Aufhebung der Aktivität der CaMKII zu erwarten ist, könnte auch die Erholung von einer

intrazellulären Azidose infolge der pharmakologischen Inhibition weniger stark beeinträchtigt sein. Bis zu einem experimentellen Nachweis ist es jedoch denkbar, dass eine CaMKII-Inhibition mit Substanzen wie AS100105 unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen, die mit einem erhöhten Risiko für eine Azidose einhergehen, kontraindiziert sein könnte. Im Allgemeinen bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch das hohe Potenzial der CaMKII-Inhibition für die Behandlung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien und präsentieren darüber hinaus in Form des neuartigen CaMKII-Inhibitors AS100105 einen hochinteressanten Kandidaten auf dem Weg zur Entwicklung eines wirksamen Medikaments.

5 Zusammenfassung

Die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist ein wichtiges Regulationsprotein des kardialen Ca^{2+} -Haushalts. Bei Herzinsuffizienz und kardialen Arrhythmien wurde eine Überaktivität der CaMKII festgestellt. Insbesondere ein verstärkter diastolischer Ca^{2+} -Verlust aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den kardialen Ryanodin-Rezeptor (RyR2) gilt dabei als entscheidender CaMKII-abhängiger Pathomechanismus („diastolisches SR Ca^{2+} -Leck“). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Effekte des neuartigen CaMKII-Inhibitors AS100105 auf den kardiomyozytären Ca^{2+} -Haushalt untersucht. Dazu wurden Kardiomyozyten aus humanem Vorhofmyokard und aus Herzen von transgen die CaMKII überexprimierenden (und dadurch herzinsuffizienten) Mäusen isoliert und mittels Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffen unter Verwendung konfokal- und epifluoreszenzmikroskopischer Methoden untersucht.

In CaMKII-überexprimierenden murinen Kardiomyozyten führte AS100105 zu einer deutlichen Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks um 64,93 %. Durch Untersuchung des Verhältnisses von SR Ca^{2+} -Leck zur SR Ca^{2+} -Beladung konnte dieser Effekt von AS100105 auf eine Verbesserung der „Dichtigkeit“ der RyR2 zurückgeführt werden. Der neuartige CaMKII-Inhibitor führte so zu einer verbesserten Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR und erhöhte den SR Ca^{2+} -Gehalt, was in einem positiv inotropen Effekt mit verstärkter systolischer Ca^{2+} -Freisetzung und Kontraktilität der Kardiomyozyten bei basaler elektrischer Stimulation resultierte. Der CaMKII-Inhibitor AS100105 zeigte dabei unter basalen Bedingungen keine störenden Einflüsse auf die elektromechanische Kopplung. Kraft-Frequenz-Beziehung und die frequenzabhängige Beschleunigung der diastolischen Relaxation der Kardiomyozyten wurden durch AS100105 nicht beeinträchtigt und es ergab sich kein negativer Einfluss auf die Funktion der entscheidenden Ca^{2+} -eliminierenden Transporter SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX). Die deutliche Verringerung des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks durch AS100105, als Schlüsselergebnis dieser Arbeit, konnte in humanen atrialen Kardiomyozyten bestätigt werden. AS100105 reduzierte die Größe und Frequenz von unsynchronisierten diastolischen SR Ca^{2+} -Freisetzungseignissen aus RyR2-Clustern („ Ca^{2+} -Sparks“) und reduzierte so das diastolische SR Ca^{2+} -Leck in den Vorhofkardiomyozyten um 37,92 %. Zudem konnte AS100105 das Auftreten von arrhythmogenen spontanen zellulären Ca^{2+} -Freisetzungen („SCaFs“) in diesen Zellen um 53,05 % verringern.

Im Gegensatz zu den etablierten experimentellen CaMKII-Inhibitoren zählt AS100105 zur ersten Generation von Substanzen, die speziell mit dem Ziel einer therapeutischen Anwendung entwickelt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren in vitro die Wirksamkeit von AS100105 in Bezug auf pathologische Veränderungen des kardiomyozytären Ca^{2+} -Haushalts bei Herzinsuffizienz und Arrhythmien. Eine Verträglichkeit von AS100105 im Sinne der Aufrechterhaltung wichtiger physiologischer Abläufe der elektromechanischen Kopplung scheint dabei gewährleistet zu sein. Zweifelsohne ist umfangreiche weitere Forschung nötig, aber zu diesem Zeitpunkt erscheint der neuartige CaMKII-Inhibitor AS100105 als vielversprechender Kandidat auf dem Weg zur Entwicklung eines neuen Wirkstoffs zur Behandlung der Herzinsuffizienz und von kardialen Arrhythmien.

6 Literaturverzeichnis

1. Remme WJ, McMurray JJV, Rauch B, Zannad F, Keukelaar K, Cohen-Solal A, et al. Public awareness of heart failure in Europe: first results from SHAPE. *Eur Heart J*. 2005 Nov;26(22):2413–21.
2. Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res*. 1998 Feb;37(2):279–89.
3. Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiol Bethesda Md*. 2006 Dec;21:380–7.
4. Neef S, Maier LS. Remodeling of excitation-contraction coupling in the heart: inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak as a novel therapeutic approach. *Curr Heart Fail Rep*. 2007 Mar;4(1):11–7.
5. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res*. 2003 May 2;92(8):904–11.
6. Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, et al. Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1150–61.
7. Packer DL, Prutkin JM, Hellkamp AS, Mitchell LB, Bernstein RC, Wood F, et al. Impact of implantable cardioverter-defibrillator, amiodarone, and placebo on the mode of death in stable patients with heart failure: analysis from the sudden cardiac death in heart failure trial. *Circulation*. 2009 Dec 1;120(22):2170–6.
8. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009 Nov;2(6):664–75.
9. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, et al. CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res*. 2010 Apr 2;106(6):1134–44.
10. Mustroph J, Neef S, Maier LS. CaMKII as a target for arrhythmia suppression. *Pharmacol Ther*. 2017 Aug 1;176(Supplement C):22–31.
11. Pellicena P, Schulman H. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 Feb 20;5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3929941/>

12. WHO. WHO (1995) Physician Guidelines (for GPs) designed to be translated and distributed worldwide to primary care physicians. 1995.
13. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007 Sep 1;93(9):1137–46.
14. Roger VL. Epidemiology of Heart Failure. *Circ Res*. 2013 Aug 30;113(6):646–59.
15. Schmidt S, Hendricks V, Griebenow R, Riedel R. Demographic change and its impact on the health-care budget for heart failure inpatients in Germany during 1995–2025. *Herz*. 2013 Dec;38(8):862–7.
16. Statistisches Bundesamt. Statistisches Bundesamt: Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2015. (Fachserie 12 Reihe 4); Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2017 [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 8]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>
17. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KKL, et al. Long-Term Trends in the Incidence of and Survival with Heart Failure. *N Engl J Med*. 2002 Oktober;347(18):1397–402.
18. Packer M. Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation*. 1985 Oct;72(4):681–5.
19. Quiñones MA, Zile MR, Massie BM, Kass DA, Writing Committee of the Dartmouth Diastolic Discourses. Chronic heart failure: a report from the Dartmouth Diastole Discourses. *Congest Heart Fail Greenwich Conn*. 2006 Jun;12(3):162–5.
20. Bronzwaer JGF, Paulus WJ. Diastolic and systolic heart failure: different stages or distinct phenotypes of the heart failure syndrome? *Curr Heart Fail Rep*. 2009 Dec;6(4):281–6.
21. Shah SJ, Katz DH, Deo RC. Phenotypic Spectrum of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Heart Fail Clin*. 2014 Jul;10(3):407–18.
22. Tschöpe C, Post H. Latent ischaemia as a trigger for a *circulus vitiosus* of inflammation, fibrosis, and stiffness in HFPEF: Editorial Comment. *Eur J Heart Fail*. 2015 Dec;17(12):1210–2.
23. Heusch G. Diastolic heart failure: a misNOMer. *Basic Res Cardiol*. 2009 Sep;104(5):465–7.
24. De Keulenaer GW, Brutsaert DL. Systolic and Diastolic Heart Failure Are Overlapping Phenotypes Within the Heart Failure Spectrum. *Circulation*. 2011 May 10;123(18):1996–2005.

25. Solomon SD, Anavekar N, Skali H, McMurray JJV, Swedberg K, Yusuf S, et al. Influence of ejection fraction on cardiovascular outcomes in a broad spectrum of heart failure patients. *Circulation*. 2005 Dec 13;112(24):3738–44.
26. Gaasch WH, Delorey DE, Kueffer FJ, Zile MR. Distribution of left ventricular ejection fraction in patients with ischemic and hypertensive heart disease and chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 2009 Nov 15;104(10):1413–5.
27. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed*. 2016 Dec;69(12):1167.
28. Barasch E, Gottdiener JS, Aurigemma G, Kitzman DW, Han J, Kop WJ, et al. Association between elevated fibrosis markers and heart failure in the elderly: the cardiovascular health study. *Circ Heart Fail*. 2009 Jul;2(4):303–10.
29. Lee DS, Gona P, Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Wang TJ, et al. Relation of Disease Pathogenesis and Risk Factors to Heart Failure With Preserved or Reduced Ejection Fraction: Insights From the Framingham Heart Study of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation*. 2009 Jun 23;119(24):3070–7.
30. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 2. Auflage. Version 2 [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 8]. Available from: www.herzinsuffizienz.versorgungsleitlinien.de
31. Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jul 23;62(4):263–71.
32. Shah AM, Solomon SD. Phenotypic and pathophysiological heterogeneity in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J*. 2012 Jul;33(14):1716–7.
33. Neef S, Maier LS. Novel aspects of excitation-contraction coupling in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2013 Jul;108(4):360.
34. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):198–205.
35. Fabiato A, Fabiato F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol*. 1975 Aug;249(3):469–95.
36. Hove-Madsen L, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and thapsigargin

- sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 1993 Nov;73(5):820–8.
37. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol.* 1994 Apr 15;476(2):279–93.
38. Negretti N, O'Neill SC, Eisner DA. The relative contributions of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1993 Oct;27(10):1826–30.
39. Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol.* 1998 Apr;274(4 Pt 2):H1335–1347.
40. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:417–45.
41. Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem.* 1989 Oct 25;264(30):17907–12.
42. Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Mar 10;1221(1):89–101.
43. Srinivasan M, Edman CF, Schulman H. Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol.* 1994 Aug;126(4):839–52.
44. Bennett MK, Erondy NE, Kennedy MB. Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain. *J Biol Chem.* 1983 Oct 25;258(20):12735–44.
45. Kanaseki T, Ikeuchi Y, Sugiura H, Yamauchi T. Structural features of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy. *J Cell Biol.* 1991 Nov;115(4):1049–60.
46. Colbran RJ, Smith MK, Schworer CM, Fong YL, Soderling TR. Regulatory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Mechanism of inhibition and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1989 Mar 25;264(9):4800–4.
47. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science.* 1992 May 22;256(5060):1199–202.
48. Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H. Activation of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Dec;83(24):9497–501.

49. Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR. Reversible generation of a Ca^{2+} -independent form of Ca^{2+} -(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem*. 1986 Jul 5;261(19):8581–4.
50. De Koninck P, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca^{2+} oscillations. *Science*. 1998 Jan 9;279(5348):227–30.
51. Schulman H, Hanson PI, Meyer T. Decoding calcium signals by multifunctional CaM kinase. *Cell Calcium*. 1992 Jul;13(6–7):401–11.
52. Ishida A, Shigeri Y, Taniguchi T, Kameshita I. Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Ther*. 2003 Dec;100(3):291–305.
53. Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*. 2008 May 2;133(3):462–74.
54. Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 2013 Oct 17;502(7471):372–6.
55. Zhang T, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, et al. CaMKII δ isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J Biol Chem*. 2007 Nov 30;282(48):35078–87.
56. Zhu W-Z, Wang S-Q, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, et al. Linkage of β 1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II. *J Clin Invest*. 2003 Mar;111(5):617–25.
57. Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP. Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2000 Jul 21;275(29):22532–6.
58. Tada M, Inui M, Yamada M, Kadoma M, Kuzuya T, Abe H, et al. Effects of phospholamban phosphorylation catalyzed by adenosine 3':5'-monophosphate- and calmodulin-dependent protein kinases on calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*. 1983 May;15(5):335–46.
59. Wehrens XHT, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:69–98.
60. Rodriguez P, Bhogal MS, Colyer J. Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3;278(40):38593–600.

61. Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem*. 1991 Jun 15;266(17):11144–52.
62. Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM. The effect of Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol*. 1997 May 15;501 (Pt 1):17–31.
63. Wu Y, Colbran RJ, Anderson ME. Calmodulin kinase is a molecular switch for cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2877–81.
64. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, et al. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na^{+} channels. *J Clin Invest*. 2006 Dec;116(12):3127–38.
65. Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, et al. Ca /calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009 Jun;2(3):285–94.
66. Guilbert A, Lim HJ, Cheng J, Wang Y. CaMKII-dependent myofilament Ca^{2+} desensitization contributes to the frequency-dependent acceleration of relaxation. *Cell Calcium*. 2015 Nov;58(5):489–99.
67. Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, et al. Crucial role for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*. 2013 Feb 15;112(4):664–74.
68. Kushnir A, Shan J, Betzenhauser MJ, Reiken S, Marks AR. Role of CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 1;107(22):10274–9.
69. Wu Y, Luczak ED, Lee E-J, Hidalgo C, Yang J, Gao Z, et al. CaMKII effects on inotropic but not lusitropic force frequency responses require phospholamban. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Sep;53(3):429–36.
70. Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA. Multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca^{2+} -induced enhancement of the L-type Ca^{2+} current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res*. 1994 Nov;75(5):854–61.
71. Yuan W, Bers DM. Ca -dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca -calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol*. 1994 Sep;267(3 Pt 2):H982–993.
72. Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM. CaMKII is responsible for activity-dependent

- acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1995 Feb;268(2 Pt 2):H703-712.
73. Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 11;97(8):4070–5.
74. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1853–64.
75. Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation.* 1992 Mar;85(3):1046–55.
76. Beuckelmann DJ, Erdmann E. Ca(2+)-currents and intracellular [Ca2+]i-transients in single ventricular myocytes isolated from terminally failing human myocardium. *Basic Res Cardiol.* 1992;87 Suppl 1:235–43.
77. Pieske B, Sütterlin M, Schmidt-Schweda S, Minami K, Meyer M, Olschewski M, et al. Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular Ca2+ handling. *J Clin Invest.* 1996 Aug 1;98(3):764–76.
78. Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ. Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Apr;30(4):743–9.
79. Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca2+ handling and sarcoplasmic reticulum Ca2+ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* 1999 Jul 9;85(1):38–46.
80. Schillinger W, Lehnart SE, Prestle J, Preuss M, Pieske B, Maier LS, et al. Influence of SR Ca(2+)-ATPase and Na(+)-Ca(2+)-exchanger on the force-frequency relation. *Basic Res Cardiol.* 1998;93 Suppl 1:38–45.
81. Schwinger RH, Münch G, Bölk B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serine-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Mar;31(3):479–91.
82. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1995 Aug 15;92(4):778–84.
83. Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bøkenes J, Tønnessen T, Holt E, et al. Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major

- contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res.* 2002 Feb 1;53(2):382–91.
84. Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, et al. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 Jan;29(1):265–72.
85. Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative assessment of the SR Ca^{2+} leak-load relationship. *Circ Res.* 2002 Oct 4;91(7):594–600.
86. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembli N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 2000 May 12;101(4):365–76.
87. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ Res.* 2005 Dec 9;97(12):1314–22.
88. Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, et al. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res.* 2006 Feb 3;98(2):235–44.
89. Santiago DJ, Curran JW, Bers DM, Lederer WJ, Stern MD, Ríos E, et al. Ca sparks do not explain all ryanodine receptor-mediated SR Ca leak in mouse ventricular myocytes. *Biophys J.* 2010 May 19;98(10):2111–20.
90. Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Doi M, Tokuhisa T, Okuda S, et al. FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation.* 2003 Jan 28;107(3):477–84.
91. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, et al. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res.* 2003 May 2;92(8):912–9.
92. Benkusky NA, Weber CS, Scherman JA, Farrell EF, Hacker TA, John MC, et al. Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.* 2007 Oct 12;101(8):819–29.
93. Jiang MT, Lokuta AJ, Farrell EF, Wolff MR, Haworth RA, Valdivia HH. Abnormal Ca^{2+} release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ Res.* 2002 Nov 29;91(11):1015–22.
94. Xiao B, Jiang MT, Zhao M, Yang D, Sutherland C, Lai FA, et al. Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res.* 2005 Apr

- 29;96(8):847–55.
95. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*. 1982 Jul 22;307(4):205–11.
 96. Curran J, Hinton MJ, Ríos E, Bers DM, Shannon TR. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res*. 2007 Feb 16;100(3):391–8.
 97. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, et al. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak and increased Na^{+} - Ca^{2+} exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 2012 May 1;125(17):2059–70.
 98. Li Y, Kranias EG, Mignery GA, Bers DM. Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res*. 2002 Feb 22;90(3):309–16.
 99. Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM. Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res*. 2006 Aug 18;99(4):398–406.
 100. Hagemann D, Bohlender J, Hoch B, Krause EG, Karczewski P. Expression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II delta-subunit isoforms in rats with hypertensive cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem*. 2001 Apr;220(1–2):69–76.
 101. Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, et al. Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res*. 2012 May 25;110(11):1474–83.
 102. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1999 Apr 2;84(6):713–21.
 103. Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J. Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res*. 1999 Apr;42(1):254–61.
 104. Bers DM. CaMKII inhibition in heart failure makes jump to human. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1044–6.
 105. Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, et al. The Cardiac-specific Nuclear B Isoform of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Induces Hypertrophy and Dilated Cardiomyopathy Associated with Increased Protein Phosphatase 2A Activity. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1261–7.

106. Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, et al. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in human cardiac pathology. *Circulation*. 2013 Aug 27;128(9):970–81.
107. Song Y, Shryock JC, Belardinelli L. An increase of late sodium current induces delayed afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 May;294(5):H2031-2039.
108. Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzura I, Zhang W, Trimble R, et al. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2002 Sep 3;106(10):1288–93.
109. January CT, Moscucci A. Cellular mechanisms of early afterdepolarizations. *Ann N Y Acad Sci*. 1992 Jan 27;644:23–32.
110. Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Wu Y, Schulman H, et al. KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998 Dec;287(3):996–1006.
111. Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, et al. The δ isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 17;106(7):2342–7.
112. Zhang R, Khoo MSC, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4):409–17.
113. Tokumitsu H, Chijiwa T, Hagiwara M, Mizutani A, Terasawa M, Hidaka H. KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*. 1990 Mar 15;265(8):4315–20.
114. Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, et al. The newly synthesized selective Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Dec 31;181(3):968–75.
115. Rezazadeh S, Claydon TW, Fedida D. KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Apr;317(1):292–9.

116. Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H. A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jul 26;212(3):806–12.
117. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Aug;34(8):919–39.
118. Wu Y, Gao Z, Chen B, Koval OM, Singh MV, Guan X, et al. Calmodulin kinase II is required for fight or flight sinoatrial node physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 7;106(14):5972–7.
119. Chang BH, Mukherji S, Soderling TR. Characterization of a calmodulin kinase II inhibitor protein in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 1;95(18):10890–5.
120. Mavunkel B, Xu Y-J, Goyal B, Lim D, Lu Q, Chen Z, et al. Pyrimidine-based inhibitors of CaMKII δ . *Bioorg Med Chem Lett.* 2008 Apr 1;18(7):2404–8.
121. Neef S, Steffens A, Pellicena P, Mustroph J, Lebek S, Ort KR, et al. Improvement of cardiomyocyte function by a novel pyrimidine-based CaMKII-inhibitor. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Feb 1;115:73–81.
122. Neef S, Sag CM, Daut M, Bäumer H, Grefe C, El-Armouche A, et al. While systolic cardiomyocyte function is preserved, diastolic myocyte function and recovery from acidosis are impaired in CaMKII δ -KO mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Jun;59:107–16.
123. Voigt N, Makary S, Nattel S, Dobrev D. Voltage-clamp-based methods for the detection of constitutively active acetylcholine-gated I(K,ACh) channels in the diseased heart. *Methods Enzymol.* 2010;484:653–75.
124. Spence MTZ, Johnson ID. The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation; 2010.
125. Bers D. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2nd edition. Dordrecht; Boston: Springer; 2001. 427 p.
126. Primessnig U, Schönleitner P, Höll A, Pfeiffer S, Bracic T, Rau T, et al. Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2016 Aug;18(8):987–97.
127. Györke S, Lukyanenko V, Györke I. Dual effects of tetracaine on spontaneous calcium release in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1997 Apr 15;500 (Pt 2):297–309.
128. Ljubojević S, Walther S, Asgarzoei M, Sedej S, Pieske B, Kockskämper J. In situ calibration of nucleoplasmic versus cytoplasmic Ca²⁺ concentration in adult cardiomyocytes. *Biophys J.* 2011 May 18;100(10):2356–66.
129. Curran J, Brown KH, Santiago DJ, Pogwizd S, Bers DM, Shannon TR. Spontaneous

- Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jul;49(1):25–32.
130. Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Sep;293(3):C1073-1081.
131. Bassani JW, Yuan W, Bers DM. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1995 May;268(5 Pt 1):C1313-1319.
132. Currie S, Loughrey CM, Craig M-A, Smith GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J.* 2004 Jan 15;377(Pt 2):357–66.
133. Bowditch HP. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Sächs Akad Wiss.* 1871;23:652–689.
134. Schouten VJ, ter Keurs HE. Role of Ica and $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in the force-frequency relationship of rat heart muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 1991 Sep;23(9):1039–50.
135. Kurihara S, Sakai T. Effects of rapid cooling on mechanical and electrical responses in ventricular muscle of guinea-pig. *J Physiol.* 1985 Apr;361:361–78.
136. Maier LS, Bers DM, Pieske B. Differences in Ca^{2+} -handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Dec;32(12):2249–58.
137. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, et al. Relationship between Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation.* 1999 Feb 9;99(5):641–8.
138. DeSantiago J, Maier LS, Bers DM. Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Aug;34(8):975–84.
139. Zhao W, Uehara Y, Chu G, Song Q, Qian J, Young K, et al. Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Aug;37(2):607–12.
140. Huke S, Bers DM. Temporal dissociation of frequency-dependent acceleration of relaxation and protein phosphorylation by CaMKII. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Mar;42(3):590–9.
141. Kassiri Z, Myers R, Kaprielian R, Banijamali HS, Backx PH. Rate-dependent changes of twitch force duration in rat cardiac trabeculae: a property of the contractile system. *J Physiol.* 2000 Apr 1;524 Pt 1:221–31.

142. Valverde CA, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Vittone L, Salas M, et al. Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: a property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation. *J Physiol*. 2005 Feb 1;562(Pt 3):801–13.
143. van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, et al. Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation*. 2010 Dec 21;122(25):2669–79.
144. Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort RJ, Skapura DG, et al. Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest*. 2009 Jul;119(7):1940–51.
145. Pedersen TH, Gurung IS, Grace A, Huang CL-H. Calmodulin kinase II initiates arrhythmogenicity during metabolic acidification in murine hearts. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2009 Sep;197(1):13–25.
146. Liu N, Ruan Y, Denegri M, Bachetti T, Li Y, Colombi B, et al. Calmodulin kinase II inhibition prevents arrhythmias in RyR2(R4496C+/-) mice with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Jan;50(1):214–22.
147. Di Pasquale E, Lodola F, Miragoli M, Denegri M, Avelino-Cruz JE, Buonocore M, et al. CaMKII inhibition rectifies arrhythmic phenotype in a patient-specific model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Cell Death Dis*. 2013 Oct 10;4:e843.
148. Wang W, Zhang S, Deng J, Zhao J, Zhao C, Lin L, et al. KN-93, A CaMKII inhibitor, suppresses ventricular arrhythmia induced by LQT2 without decreasing TDR. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban*. 2013 Oct;33(5):636–9.
149. Terentyev D, Rees CM, Li W, Cooper LL, Jindal HK, Peng X, et al. Hyperphosphorylation of RyRs underlies triggered activity in transgenic rabbit model of LQT2 syndrome. *Circ Res*. 2014 Nov 7;115(11):919–28.
150. Erondy NE, Kennedy MB. Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1985 Dec;5(12):3270–7.
151. Lisman JE, Goldring MA. Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jul;85(14):5320–4.

152. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993 Jan 7;361(6407):31–9.
153. Mattiazzi A, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis. *Cardiovasc Res*. 2007 Mar 1;73(4):648–56.

7 Anhang

7.1 Charakteristika der Gewebespenderinnen und Gewebespender

Tabelle 7-1: Charakteristika der Gewebespenderinnen und Gewebespender

PROBE	PATIENT/IN		OP-INDIKATION			EKG				ECHOKARDIOGRAPHIE							
Nr.*	Alter	Geschlecht	ACB	AKE	MKR/-E	VHF	Typ	Rhythmus prä-OP	Frequenz prä-OP	EF (%)	AS	AI	PS	PI	MS	MI	TI
1	83	m	+			nein		SR	normofrequent	30%	-	-	-	-	-	-	-
3	60	m	+			ja	persistierend	VHF	99/min	30-35%	-	-	-	-	-	II*	-
5	62	m	+			ja	paroxysmal	SR	56/min	normal	-	I*	-	-	-	-	-
6	39	m	+			nein		SR	85/min	normal	-	-	-	-	-	-	-
7	51	w	+			nein		SR	62/min	> 60%	-	-	-	-	-	I*	-
8	76	w	+	+		ja	paroxysmal	SR	62/min	55%	III*	I*-II*	-	-	-	I*	I*
9	54	m	+			nein		SR	53/min	> 55%	I-II*	-	-	-	-	-	-
10	65	m	+			nein		SR	75/min	35-40%	-	-	-	-	-	I*	I-II*
11	73	m	+			nein		SR	72/min	normal	-	-	-	I*	-	I*	I*
12	81	m	+	+		nein		SR	55/min	normal	III*	I-II*	-	-	-	I*	I*
13	67	m	+	+		ja	paroxysmal	SR	55/min	> 60%	-	-	-	-	-	I*	-
14	49	m	+			nein		SR	92/min	60%	-	-	-	-	-	-	-
15	75	m	+			nein		SR	71/min	normal	-	-	-	-	-	I*	-
16	41	m	+			nein		SR	98/min	normal	-	-	-	-	-	-	-
17	58	m	+			nein		SR	57/min	50%	-	-	-	-	-	I*	-
19	62	m	+		+	ja	persistierend	VHF	73/min	normal	-	II-III*	-	-	-	I-II*	I*
20	53	m	+			nein		SR	71/min	normal	-	-	-	-	-	I*	-
21	72	m	+			nein		SR	72/min	50%	-	I*	-	-	-	-	-
22	75	w	+	+		nein		SR	74/min	65%	III*	-	-	-	-	I*	-
23	76	m	+			ja	paroxysmal	VHF	72/min	eingeschränkt	-	-	-	-	-	I*	-
24	66	m	+		+	ja	paroxysmal	SR	81/min	40%	-	-	-	-	-	II*	-

PROBE	VORERKRANKUNGEN						MEDIKATION								
Nr.*	KHK	aHTN	DM	HLP	Adipositas	Tabak-abusus	β-Blocker	Dosis	Grad der Ausdosierung	ACE-Hemmer / Sartan	Dosis	Verapamil / Diltiazem	Anti-arrhythmika	Dosis	Sonstiges
1	+	+	+	-	-	-	Metoprolol	47,5 mg	25,0 %	Valsartan	320 mg	-	-	-	Katecholamine
3	+	+	-	+	-	-	Bisoprolol	5 mg	50,0 %	Enalapril	10 mg	-	Amiodaron	200 mg	-
5	+	+	-	+	+	-	Nebivolol	2,5 mg	50,0 %	Telmisartan	80 mg	-	-	-	-
6	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	-	+	Bisoprolol	7,5 mg	75,0 %	Candesartan	48 mg	-	-	-	-
8	+	+	-	+	+	-	Bisoprolol	5 mg	50,0 %	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	+	Metoprolol	23,75 mg	12,5 %	Candeartan	32 mg	-	-	-	-
10	+	-	-	+	-	+	Nebivolol	2,5 mg	50,0 %	Ramipril	2,5 mg	-	-	-	-
11	+	+	+	+	+	-	Metoprolol	95 mg	50,0 %	Candesartan	32 mg	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	-	+	-	-	Bisoprolol	5 mg	50,0 %	-	-	-	Flecainid	100 mg	-
14	+	+	-	-	-	+	Metoprolol	95 mg	50,0 %	Ramipril	5 mg	-	-	-	-
15	+	+	-	+	-	-	Metoprolol	75 mg	39,4 %	Valsartan	240 mg	-	-	-	Ranolazin 1000 mg
16	+	+	+	-	+	+	-	-	-	Olmesartan	40 mg	-	-	-	-
17	+	+	-	-	-	+	Bisoprolol	2,5 mg	25,0 %	Ramipril	10 mg	-	-	-	-
19	-	+	-	+	-	-	Bisoprolol	5 mg	50,0 %	Ramipril	10 mg	-	Amiodaron	200 mg	-
20	+	+	-	-	-	+	Bisoprolol	2,5 mg	25,0 %	Ramipril	1,25 mg	-	-	-	-
21	+	+	+	+	-	-	Bisoprolol	5 mg	50,0 %	Valsartan	80 mg	-	-	-	-
22	+	+	+	-	+	+	Bisoprolol	1,25 mg	12,5 %	Ramipril	5 mg	-	-	-	-
23	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Enalapril	10 mg	-	-	-	-
24	+	+	-	-	-	-	Nebivolol	2,5 mg	50,0 %	Lisinopril	10 mg	-	-	-	-

*Proben mit schlechter Zellqualität wurden verworfen

Abkürzungen: ACB (Aorto-Coronarer-Bypass), aHTN (Arterielle Hypertonie), AI (Aortenklappeninsuffizienz), AKE (Aortenklappenersatz), AS (Aortenklappenstenose), DM (Diabetes mellitus), EF (Ejektionsfraktion), HLP (Hyperlipoproteinämie), KHK (Koronare Herzkrankheit), MI (Mitralklappeninsuffizienz), MKR/-E (Mitralklappenrekonstruktion/-ersatz), MS (Mitralklappenstenose), PI (Pulmonalklappeninsuffizienz), PS (Pulmonalklappenstenose), SR (Sinusrhythmus), TI (Trikuspidalklappeninsuffizienz), VHF (Vorhofflimmern)

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Lars Maier aussprechen, der mich für die Erforschung des therapeutischen Potenzials des von mir untersuchten neuartigen CaMKII-Inhibitors AS100105 in Bezug auf Herzinsuffizienz und Arrhythmien begeistern konnte.

Besonderer Dank gilt vor allem auch dem wissenschaftlichen Betreuer meiner Dissertation Dr. Stefan Neef. Sein engagierter Einsatz war eine unverzichtbare Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche zu dieser Arbeit sowie bei der Verschriftlichung ihrer Ergebnisse.

Die herausragende wissenschaftliche Expertise meines Doktorvaters und meines Betreuers ermöglichte mir die Wahl und Anwendung geeigneter Methoden zur Untersuchung der Effekte des CaMKII-Inhibitors AS100105 auf die elektromechanische Kopplung und das SR Ca^{2+} -Leck in murinen und humanen Kardiomyozyten.

Zu großem Dank bin ich zudem den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Maier verpflichtet. Die qualitativ hochwertige Isolation der murinen und humanen Kardiomyozyten durch Felicia Radtke und Timo Schulte bildete die Grundlage meiner weiterführenden Versuche. Thomas Sowa möchte ich für die unermüdliche Hilfe bei der Behebung von Problemen bei Gerätschaften und Labormaterialien danken. Für die Einarbeitung in die wissenschaftlichen Methoden möchte ich mich zudem bei Anna Ernst bedanken.

